

DIE BIOSYNTHESE DER RAUWOLFIA-ALKALOIDE
SARPAGIN UND AJMALIN

ARTUR PFITZNER

Diss München
1984

Rauwolfia serpentina Benth.

nach

Georg Eberhard RUMPF

"Herbarii Amboinensis Auctuarium", Amsterdam 1755



A: Gewöhnliche, gerade Wurzel

B: Krumme Wurzel

D: Früchte

C: Blüte

E: Samen

DIE BIOSYNTHESE DER RAUWOLFIA-ALKALOIDE
SARPAGIN UND AJMALIN

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Artur Pfitzner
aus
Emmerich

Januar 1984

1. Referent: Doz. Dr. J. Stöckigt
2. Referent: Prof. Dr. G. Hartmann

Eingereicht am: 23. 1. 1984

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 2. 1984

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODEN	9
A. <u>Material</u>	9
1. Pflanzliches Material	9
1.1. Anzucht von Pflanzen	9
1.2. Pflanzliche Zellkulturen	9
2. Chemikalien	10
3. Geräte	11
B. <u>Methoden</u>	12
1. Synthesen	12
1.1. Synthese von [^3H -Aryl] Geissoschizin	12
1.2. Synthese von [^3H -Aryl] Quebrachidin	13
1.3. Synthese von [^3H -Methyl] Yohimbin und [^3H -Methyl] Catharanthin	13
1.4. Synthese von [^3H -Acetyl] Acetyltetra- phyllicin	14
1.5. Synthese von Polyneuridinaldehyd aus Quebrachidin	15
1.6. Synthese von Vinorin aus Acetyltetra- phyllicin	16
1.7. Synthese von Geissoschizal	17
1.8. Oxidation von Alkaloiden mit primärer Alkoholgruppe zu den entsprechenden Aldehyden	18
1.9. Reduktion mit NaBH_4	19
1.10. Acetylierung mit Acetanhydrid	19
2. Chromatographische Methoden	19
2.1. Dünnschichtchromatographie	19
2.2. Hochauflösende Flüssigkeitschromatogra- phie	20
3. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltra- tion	22

4. Bestimmung des isoelektrischen Punktes durch Chromatofokussierung	23
5. Quantitative Auswertung des Alkaloidgehaltes .	25
6. Proteinbestimmung	26
7. Radioaktivitätsmessung	26
8. Enzymtests	26
8.1. Strictosidin-Synthase	26
8.2. Unspezifische Esterasen	27
9. Herstellung eines zellfreien Rohextraktes nach U.SEIPEL (1979)	27
10. Aufschluß von differenzierten Pflanzen	28

III. E R G E B N I S S E 29

A. <u>Untersuchungen zur Bedeutung des Geissoschizins für die Biosynthese der Heteroyohimbin-Typ Alkaloiden in Catharanthus roseus</u>	29
1. Experimente mit [21-D] Geissoschizin	29
1.1. Synthese von [21-D] Geissoschizin aus 4,21-Dehydrogeissoschizin	29
1.2. Zellfreier Umsatz von [21 α -D] Geissoschizin zu Alkaloiden der Heteroyohimbin-Gruppe	30
2. <u>In vivo</u> und <u>in vitro</u> Experimente mit [5- ¹⁴ C, 21 α - ³ H] Geissoschizin	31
2.1. Synthese von doppelt markiertem Geissoschizin	32
2.2. Inkubation des doppelt markierten Geissoschizins mit einer Enzympräparation aus <u>C. roseus</u> Zellkulturen	33
2.3. Fütterungsexperimente an <u>C. roseus</u> Pflanzen	34

	Seite
3. Geissoschizin-Dehydrogenase aus <u>C. roseus</u>	
Zellkulturen	34
3.1. Enzymtest für die Geissoschizin-	
Dehydrogenase	35
3.2. Anreicherung der Geissoschizin-Dehydro-	
genase aus <u>C. roseus</u> Zellkulturen	35
3.2.1. Gewebeaufschluß	35
3.2.2. Chromatographie an DEAE-Cellulose	36
3.2.3. Gelfiltration an ACA 54	37
3.3. Charakterisierung der Geissoschizin-	
Dehydrogenase	39
3.3.1. pH-Abhängigkeit	39
3.3.2. Molekulargewichtsbestimmung	
durch Gelfiltration	40
3.3.3. Einfluß der Substratkonzentration	
auf die Aktivität der Geissoschi-	
zin-Dehydrogenase	41
B. <u>Untersuchungen zur Biosynthese der Ajmalin/Sar-</u>	
<u>pagin-Typ Alkaloide in Zellkulturen von R. ser-</u>	
<u>pentina ausgehend von Geissoschizin</u>	43
1. Bestimmung des Alkaloidgehaltes von <u>R. ser-</u>	
<u>pentina</u> Suspensionskulturen	43
2. Geissoschizin-Dehydrogenase aus <u>R. serpentina</u>	
Zellkulturen	54
2.1. Vergleich der Enzyme aus <u>C. roseus</u>	
und <u>R. serpentina</u>	54
2.2. Produktcharakterisierung der Geisso-	
schizin-Dehydrogenase	56
3. Fütterung von möglichen Vorstufen der Ajmalin/	
Sarpagin-Typ Alkaloide an <u>R. serpentina</u> Zell-	
kulturen	59
4. Polyneuridinaldehyd-Esterase	61
4.1. Zellfreier Umsatz von Polyneuridin-	
aldehyd	61
4.2. Enzymtest für die Polyneuridinaldehyd-	
Esterase	63
4.3. Polyacrylamid- Gelelektrophorese	64

	Seite
4.4. Anreicherung der Polyneuridinaldehyd-	
Esterase	66
4.4.1. Gewebeaufschluß	66
4.4.2. DEAE-Cellulose Ionenaustauscher-	
chromatographie	66
4.4.3. Adsorptionschromatographie an	
Hydroxylapatit	66
4.4.4. Gelfiltration an ACA 54	67
4.5. Charakterisierung der Polyneuridinalde-	
hyd-Esterase	68
4.5.1. pH-Abhängigkeit des Umsatzes	
von Polyneuridinaldehyd	68
4.5.2. Molekulargewichtsbestimmung	68
4.5.3. Bestimmung des isoelektrischen	
Punktes	70
4.5.4. Einfluß der Substratkonzentration	
auf die Aktivität der Polyneuri-	
dinaldehyd-Esterase	71
4.5.5. Untersuchungen zum Mechanismus	
der Vellosiminbildung	72
4.5.6. Substratspezifität der Polyneuri-	
dinaldehyd-Esterase	77
4.5.7. Taxonomische Verbreitung der	
Polyneuridinaldehyd-Esterase	79
4.5.8. Versuche zur Regulation der	
Polyneuridinaldehyd-Esterase	81
5. Vellosimin-Reduktase	81
5.1. Zellfreier Umsatz von Vellosimin	81
5.2. Enzymtest für die Vellosimin-Reduktase .	83
5.3. Anreicherung der Vellosimin-Reduktase ..	84
5.3.1. Gewebeaufschluß	84
5.3.2. DEAE-Cellulose Ionenaustauscher-	
chromatographie	84
5.3.3. Adsorptionschromatographie an	
Hydroxylapatit	84
5.3.4. Gelfiltration an ACA 54	85
5.3.5. Affinitätschromatographie an	
Matrex green	86
5.4. Charakterisierung der Vellosimin-	
Reduktase	87
5.4.1. pH-Abhängigkeit des Umsatzes	
von Vellosimin	87
5.4.2. Molekulargewichtsbestimmung	89
5.4.3. Bestimmung des isoelektrischen	
Punktes	89
5.4.4. Einfluß der Substratkonzentration	
auf die Aktivität der Vellosimin-	
Reduktase	90

	Seite
5.4.5. Hemmstoffversuche zum Mechanismus der Vellosoimin-Reduktase	93
5.4.6. Versuche zur Regulation der Vellosoimin-Reduktase	94
5.4.7. Substratspezifität der Vellosoimin-Reduktase	95
5.4.8. Taxonomische Verbreitung der Vellosoimin-Reduktase	98
6. <u>In vivo</u> Untersuchungen zur Biosynthese des Sarpagins	100
7. Vinorin-Synthase	103
7.1. Zellfreie Bildung von Vinorin	103
7.2. Produktcharakterisierung der Vinorin-Synthase	104
7.2.1. Aufbau eines Enzymtests für eine Acetyljmalan-Esterase-Aktivität	104
7.2.2. Aufbau eines Enzymtests für die Vinorin-Synthase	105
7.2.3. Auftrennung von Acetyljmalan-Esterase und Vinorin-Synthase und Produktisolierung	106
7.3. Anreicherung der Vinorin-Synthase	109
7.3.1. Gewebeaufschluß	109
7.3.2. DEAE-Cellulose Ionenaustauscherchromatographie	109
7.3.3. Gelfiltration an ACA 54	110
7.3.4. Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit	110
7.3.5. Hydrophobe Chromatographie an Phenyl-Sepharose	111
7.4. Charakterisierung der Vinorin-Synthase .	114
7.4.1. pH-Abhängigkeit	114
7.4.2. Molekulargewichtsbestimmung	115
7.4.3. Bestimmung des isoelektrischen Punktes	115
7.4.4. Einfluß der Substratkonzentration auf die Aktivität der Vinorin-Synthase	115
7.4.5. Substratspezifität der Vinorin-Synthase	117
7.4.6. Untersuchungen zum Mechanismus der Vinorin-Synthase-Reaktion ...	119
7.4.7. Untersuchungen zur Regulation der Vinorin-Synthase	124
8. Fütterungsexperimente mit [³ H-Acetyl] Vinorin .	125
9. Zellfreie Synthese von Ajmalin	126

	Seite
10. Alkaloidbildung und Enzyminduktion während des Wachstums einer statischen Suspensions- kultur von <u>R. serpentina</u>	131
IV. D I S K U S S I O N	135
V. Z U S A M M E N F A S S U N G	151
VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	157

Verwendete Abkürzungen

Ci	Curie ($3.7 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$, $2.22 \times 10^{12} \text{ dpm}$)
CoA	Coenzym A
cpm	Zählrate (counts per minute)
D	Deuterium
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
dpm	Zerfallsrate (desintegrations per minute)
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoat)
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FG	Frischgewicht
IAA	Jodacetamid
kat	Katal (1 Katal entspricht der Enzymmenge, die 1 Mol Substrat pro Sekunde umsetzt)
MSH	β -Mercaptoäthanol
NAD(P) ⁺	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-(Phosphat), oxidiert
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-(Phosphat), reduziert
PB	Polybuffer
PBE	Polybuffer exchanger
2-PDS	2,2'-Dithiodipyridin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNA-Esterase	Polynuridinaldehyd-Esterase
p-NPA	p-Nitrophenylacetat
ppm	parts per million
SH-	Sulphydryl-
TG	Trockengewicht

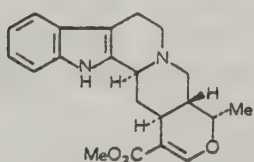
I. EINLEITUNG

Rauwolfia serpentina (L.) Benth. ex Kurz ist ein etwa 0.5 bis 1 m hoher Strauch, der in den Savannen und Wäldern von Indien, Pakistan, Burma und Indonesien verbreitet ist. Die erste botanische Beschreibung dieser Pflanze gibt CHARLES PLUMIER (1646-1704) in seinem 1703 erschienenen Buch "Nova plantarum americanarum genera". In diesem Werk benennt er die Gattung nach dem damals berühmten Augsburger Arzt, Botaniker und Weltreisenden LEONHARD RAUWOLF (1540-1596). K. SCHUMAN gliederte dann 1895 in seiner Monographie über die Apocynaceae die Gattung Rauwolfia in die Unterfamilie der Plumeroideae ein.

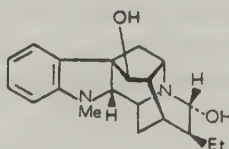
Im Herkunftsland Indien wird R. serpentina schon seit langem als Arzneipflanze verwendet. So finden sich in einem Sanskrit-lehrbuch über Medizin und Arzneimittellehre, das etwa 1000 bis 800 v. Chr. entstanden ist, Hinweise auf eine Verwendung der Wurzeldroge zur Behandlung von Schlangenbissen. Dieser volksmedizinische Gebrauch hat sich bis heute in der systematischen Benennung erhalten. Ursache dieser therapeutischen Anwendung, die auch heute noch in Indien bei der Bevölkerung verbreitet ist, scheint aber wohl eher die gewundene Form der Rauwolfiawurzel zu sein. BEIN (1956) konnte jedenfalls in Tierversuchen keine Schutzwirkung der Droge gegen letale Dosen an Kobragift finden.

Obwohl somit die Pflanze wegen ihrer Heilwirkung schon lange bekannt war, rückte sie erst in den Blickpunkt pharmazeutischen Interesses, als indische Wissenschaftler im Rahmen pharmakologischer Untersuchungen eine auffallend blutdrucksenkende und beruhigende Wirkung der Gesamtdroge feststellten (SEN und BOSE, 1931). Erste phytochemische Untersuchungen des Rauwolfiaextraktes zeigten, daß das wirksame Prinzip in der Alkaloidfraktion lokalisiert ist. Kurz darauf gelang es dann zwei indischen Chemikern die ersten fünf Alkaloide zu isolieren (SIDDQUI und SIDDQUI, 1931). Von diesen haben

Ajmalin und Ajmalicin, die nach dem Gründer des Tibbi College in Dehli, HAKIM AJMAL KHAN, benannt wurden, heute eine pharmazeutische Bedeutung in der Behandlung von Herzrhythmusstörungen sowie Störungen der peripheren und cerebralen Durchblutung (Abb. 1). Das Alkaloid aber, welches die wichtigsten Eigenschaften der Rauwolfiadröge und insbesondere die sedative Wirkung repräsentiert, wurde erst 1952 von MÜLLER, SCHLITTLER und BEIN aus Wurzeln von R. serpentina isoliert und Reserpin benannt.



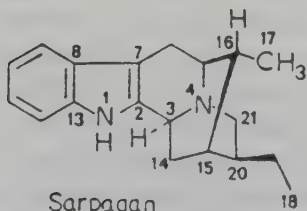
Ajmalicin



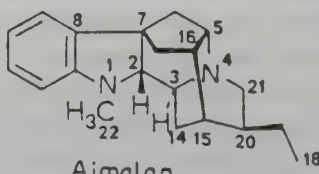
Ajmalin

Abb. 1: Alkaloide aus R. serpentina

Als in den 50er Jahren infolge wachsender therapeutischer Anwendung und aufgrund von indischen Exportbeschränkungen der Bedarf der Industrienationen an Rauwolfiawurzeln nicht mehr zu befriedigen war, setzte eine verstärkte phytochemische Bearbeitung der Plumeroideae ein. Dabei zeigte sich, daß Alkaloide mit dem Grundskelett des Ajmalins (Ajmalin-Typ) und des Sarpagins (Sarpagin-Typ) eine der größten Gruppen von strukturverwandten Indolalkaloiden darstellen (Abb. 2).



Sarpagan



Ajmalan

Abb. 2: Grundskelett von Alkaloiden der Ajmalin/Sarpagin-Gruppe

Bisher wurden 53 Verbindungen vom Ajmalin-Typ und 45 Alkaloide vom Sarpagin-Typ isoliert (KOSKINEN und LOUNASMAA, 1983), wobei die meisten in der Gattung Rauwolfia zu finden sind. Mit zunehmender Anzahl der in Rauwolfiaextrakten nachgewiesenen Alkaloide trat die Strukturaufklärung dieser Verbindungen in den Vordergrund. Dies erwies sich aufgrund des komplizierten Ringsystems beim Ajmalin als äußerst schwierig. Nach Vorarbeiten von ROBINSON in Oxford schlug dann WOODWARD (1956), 25 Jahre nach der Entdeckung des Ajmalins, ein hexazyklisches Kohlenstoffgerüst für diese Alkaloidklasse vor. Die absolute Konfiguration konnte 1961 von einer Arbeitsgruppe aus den CIBA-Forschungslaboratorien durch Abbau von Ajmalin und Sarpagin zu Alkaloiden des Corynanthe-Typs mit bekannter Raumstruktur zugeordnet werden (BARTLETT et al., 1961).

Gleichzeitig mit der Strukturaufklärung des Ajmalins entwickelten sich die ersten Hypothesen zur Biosynthese dieses Alkaloids. Nach den Vorstellungen von ROBINSON (1956) sollten Methyltryptamin und Phenylpyruvat zu einem 1-Benzyl-Tetrahydrocarbolin kondensieren (Abb. 3). Dieses Zwischenprodukt führte dann nach Reaktion mit Formaldehyd und oxidativer Öffnung des E-Ringes zu einem dem Corynantheal verwandten Alkaloid. Nach weiteren Oxidations- und Reduktionsschritten sollte dann eine Zyklisierung zum Ajmalin erfolgen. WENKERT und BRINGI (1959) wandelten dieses Postulat in soweit ab, daß zuerst Tryptamin mit Formaldehyd reagieren und dieses Produkt dann mit Shikimisäure kondensieren sollte. Beide Hypothesen wurden jedoch durch die Fütterungsexperimente von BARTON und Mitarbeitern (1965) an Rauwolfia serpentina und Rauwolfia verticillata eindeutig widerlegt. Weder mit [^{14}C]-Formaldehyd noch mit [^{14}C -Methyl]-N-Methyltryptophan, [^{14}C -Methyl]-N-Methyltryptamin oder [^3H -Methyl]Methionin fanden sie Einbau in die C-21 Position des Ajmalins und konnten somit die Annahme ausräumen, daß dieses Kohlenstoffatom in Form einer C_1 -Einheit in das Grundgerüst eingeführt wird. Dagegen erwies sich Tryptophan in Bestätigung der Versuche von LEETE (1960) als Vorstufe. Ein weiterer wichtiger Befund der Arbeit

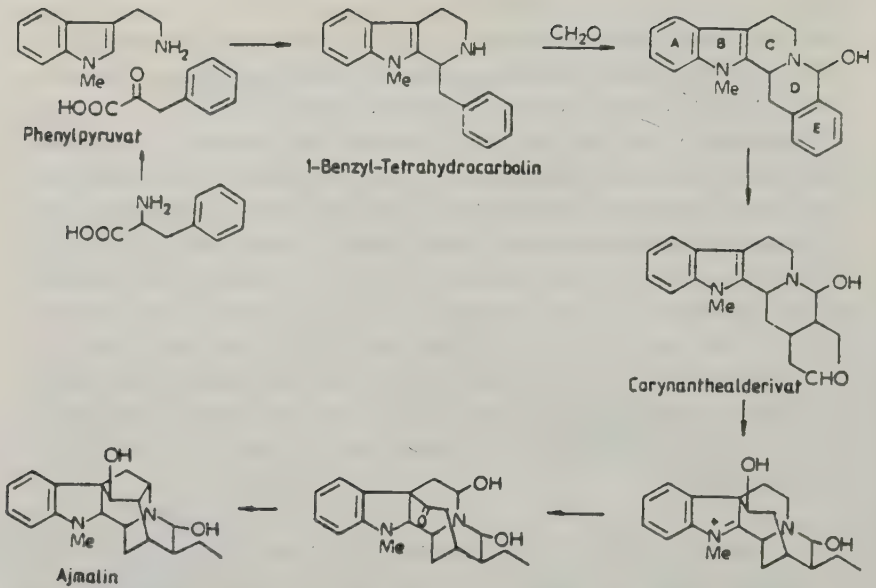


Abb. 3: Hypothese zur Ajmalinbiosynthese nach ROBINSON (1956)

von BARTON et al. (1965) war der Einbau von [^3H -Methyl]-Methionin in die C-22 Methylgruppe des Ajmalins. Außerdem konnten 21-Deoxyajmalin und Deoxyajmalal A durch in vivo Experimente als Vorstufen identifiziert werden (Abb. 4).

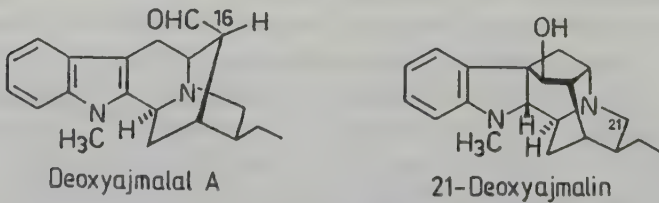
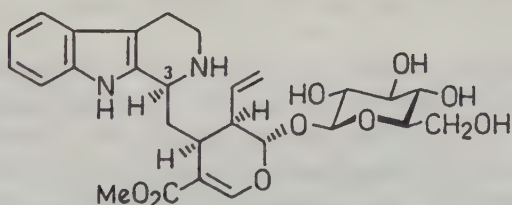


Abb. 4: Potentielle Biosynthesevorstufen des Ajmalins nach BARTON et al. (1965)

Die Herkunft der Kohlenstoffatome jedoch, die nicht aus dem Tryptamin stammen, blieb lange im Unklaren. Erst BATTERSBY bewies 1968, daß dieser Teil des Moleküls aus dem Terpenoidstoffwechsel stammt und bestätigte damit die Hypothese von THOMAS (1961). In Fütterungsexperimenten mit $[1-^3\text{H}]$ Loganin an R. serpentina konnte er diese Vorstufe in das Ajmalinskelett einbauen, wobei die ^3H -Markierung dann an C-21 lokalisiert war. 1979 fanden dann NAGAKURA, RÜFFER und ZENK nach Fütterung von Strictosidin, dem $3\alpha(\text{S})$ -Kondensationsprodukt aus Secologanin und Tryptamin, an Sprosse von R. canescens Inkorporation ins Ajmalin. Damit war gezeigt, daß Strictosidin das von THOMAS postulierte erste Reaktionsprodukt aus einem monoterpenoiden Aldehyd und Tryptamin ist (Abb. 5).



3α(S)-Strictosidin

Abb. 5: Strictosidin, Biosynthesevorstufe der Alkaloide des Ajmalin-Typs

Trotz der spärlichen experimentellen Daten zur Biogenese des Ajmalin- und Sarpaginskelettes gibt es umfangreiche Spekulationen über die Biosynthese der verschiedenen Strukturen dieser Alkaloidklasse. Die meisten wurden von COURT aufgestellt und sollten die Herkunft der Alkaloide erklären, die er aus unterschiedlichen Rauwolfiaarten isoliert hatte (IWU und COURT, 1978, 1979 und AKINLOYE und COURT, 1981). Als Ausgangssubstanzen werden hier E-seco-Indolalkaloide wie z.B. Geissoschizin postuliert, die dann über ein 4,5-Dehydrozwischenprodukt zum Sarpagin-Typ zyklisieren sollen. Diese Vorstellung

über die Eingangsreaktion des Biosyntheseweges, die COURT in seine Schemata übernommen hat, wurde 1968 von VAN TAMELEN entwickelt. Nach dieser Hypothese sollte aus 5-Carboxystrictosidin zuerst 5-Carboxygeissoschizin entstehen, was dann durch Decarboxylierung das genannte Intermediat liefert. In vivo konnte jedoch die Beteiligung von 5-Carboxystrictosidin am Aufbau des Ajmalinskeletts nicht bestätigt werden (STÖCKIGT, 1979). Eine Zusammenfassung aller vorliegenden Hypothesen zu einem vollständigeren Biosynthesevorschlag findet sich in dem 1983 erschienenen Übersichtsartikel von KOSKINEN und LOUNASMAA, wobei aber auch hier lediglich das Strictosidin als Intermediat experimentell abgesichert ist (Abb. 6). In diesem Schema sind in Form des Cathenamins, des Iminium-Cathenamins und des 4,21-Dehydrogeissoschizins, die als Zwischenprodukte vorgeschlagen werden, auch schon neuere Erkenntnisse aus der Biosynthese der Heteroyohimbin-Typ Alkaloide (z.B. Ajmalicin) berücksichtigt worden.

Im Gegensatz zum Ajmalin kann der Biosyntheseweg des Ajmalicins in seinen Grundzügen als aufgeklärt betrachtet werden. 1975 gelang es SCOTT und LEE ein zellfreies System aus Kalluskulturen von Catharanthus roseus Don., einer an Ajmalicin reichen Art der Apocynaceae, zu etablieren, mit dem sie aus Tryptamin und Secologanin Geissoschizin und Ajmalicin enzymatisch herstellen konnten. Damit war die Möglichkeit gegeben, durch Akkumulation von Zwischenprodukten detaillierte Informationen über diese Biosynthesesequenz zu gewinnen. In einem ähnlichen System aus Suspensionskulturen von C. roseus, das NAD(P)H abhängig aus Tryptamin und Secologanin die drei isomeren Heteroyohimbin-Typ Alkaloide Ajmalicin, Tetrahydroajmalicin und 19-epi-Ajmalicin bildete, wurden dann auch die beiden Intermediate 3 α (S)-Strictosidin und 20,21-Dehydroajmalicin (Cathenamin) isoliert (STÖCKIGT und ZENK, 1977, STÖCKIGT et al., 1977). Außerdem ließ sich durch Isotopenverdünnungsanalyse (RÜFFER et al., 1979) die instabile Zwischenstufe 4,21-Dehydrogeissoschizin nachweisen.

SCOTT und Mitarbeiter (1975) dagegen sahen Geissoschizin als

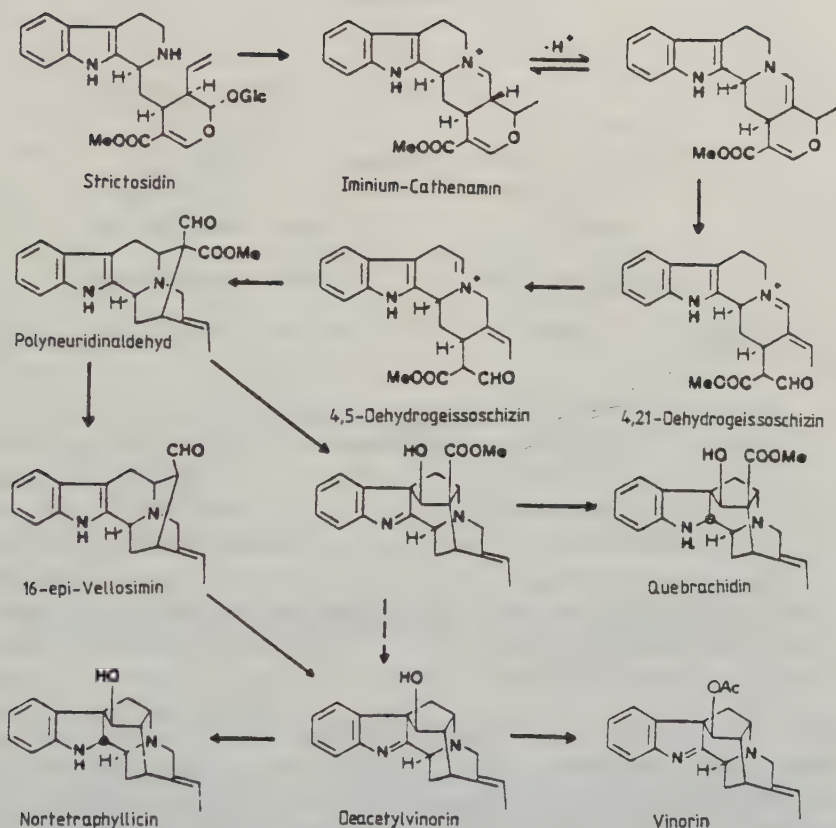


Abb. 6: Biosynthese der Alkaloide des Ajmalin/Sarpagin-Typs nach KOSKINEN und LOUNASMAA (1983)

○ 2α-Wasserstoff

● 2β-Wasserstoff

wichtiges Zwischenprodukt bei der enzymatischen Synthese von Ajmalicin an. Dabei stützten sie sich auf die Arbeiten von BATTERSBY, der in C. roseus Pflanzen Einbau von [^3H -Aryl]-Geissoschizin in Ajmalicin und andere Indolalkaloide gefunden hatte (BATTERSBY und HALL, 1969). Der Übergang von Geissoschizin zu den Heteroyohimbin-Typ Alkaloiden sollte dann

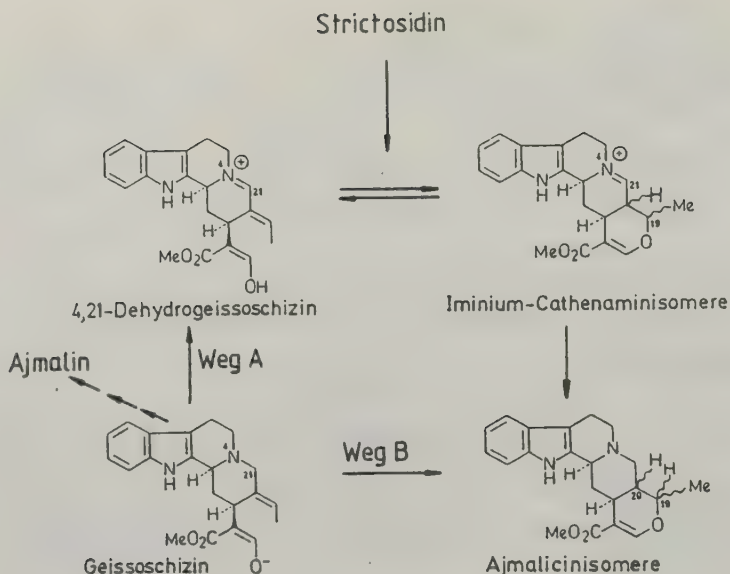


Abb. 7: Möglichkeiten der Beteiligung des Geissoschizins an der Biosynthese der Heteroyohimbin-Typ Alkaloide sowie des Ajmalins

durch Zyklisierung des E-Ringes erfolgen (Weg B, Abb. 7). Dagegen zeigte STÖCKIGT (1978), daß der zellfreie Umsatz von Geissoschizine zu den genannten Isomeren des Ajmalicins nur in Gegenwart von NADP^+ und NADPH stattfindet, also einen Oxidationsschritt und einen Reduktionsschritt erfordert (Weg A, Abb. 7). Deshalb wies er dem Geissoschizine nur eine indirekte Position in dieser Biosynthesesequenz zu.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung des Geissoschizins für die Biosynthese der Corynanthe-Typ Alkaloide auf enzymatischer Ebene zu klären. Ausgehend von dieser E-seco-Indolverbindung sollte dann der bisher unbekannte Biosyntheseweg zu den Ajmalin/Sarpagin-Typ Alkaloiden durch in vivo und in vitro Experimente an R. serpentina Zellkulturen aufgeklärt werden, um endlich Klarheit bezüglich der bestehenden Hypothesen zur Biogenese dieser strukturell komplexen Alkaloidklasse zu schaffen.

II. MATERIAL UND METHODEN

A. Material

1. Pflanzliches Material

1.1. Anzucht von Pflanzen

Die Anzucht von Catharanthus roseus Pflanzen erfolgte nach der von ARENS (1978) beschriebenen Methode. Hierzu wurde das Saatgut auf angefeuchtetes Filterpapier in Petrischalen ausgelegt. Fünf Tage nach der Keimung wurden die Sämlinge eingepflanzt und nach sechs Wochen (Vierblattstadium) für Fütterungsexperimente verwendet. Keimung, Anzucht und Fütterung erfolgten in einer Phytokammer bei $80\% \pm 1\%$ Luftfeuchtigkeit, einer Tagestemperatur von $27.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ und einer Nachttemperatur von $24.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Von 6^{00} - 22^{00} Uhr wurden die Pflanzen mit 10 000 Lux bestrahlt.

Herrn Nagy danke ich für die Kultivierung von R. serpentina, R. vomitoria, Alstonia scholaris, Tabernanthe iboga, Nauclea latifolia und Nicotiana glauca.

1.2. Pflanzliche Zellkulturen

Suspensionskulturen wurden in 1 Liter Erlenmeyerkolben mit je 250 ml Medium auf Rotationsschüttlern (100 Umdrehungen pro Minute) bei 23°C und Dauerlicht (600 Lux) angezogen. Die Kolben wurden mit jeweils 20 ml Zellmasse angeimpft und entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit nach 7-14 Tagen abgeerntet. Nach Entfernen des Kulturmediums durch Abnutschen auf einem Büchnertrichter wurde das Gewebe mit flüssigem Stick-

stoff eingefroren und bei -26°C aufbewahrt.

Kalluskulturen wuchsen in Petrischalen auf mit 1% Agar verfestigtem Medium. Für das Anlegen der Zellkulturen danke ich Frau El-Shagi und Frau Dr. Deus-Neumann.

Folgende Nährlösungen wurden für die Anzucht von Zellsuspensionskulturen verwendet:

- LS nach LINSMAIER und SKOOG (1965)
- 4x nach GAMBORG et al. (1968), modifiziert wie ULBRICH und ZENK (1979)
- DAX nach GAMBORG et al. (1968), modifiziert wie ZENK et al. (1975)
- B5C2 nach GAMBORG et al. (1968)
- AP nach ZENK et al. (1977)

2. Chemikalien

Bleitetraacetat (p.A.), N-Chlorsuccinimid (p.A.), Thionylchlorid (z.S.), Acetylchlorid (z.S.), Dimethylsulfid (z.S.) und 2,4-Pentandion (p.A.) stammten von der Firma Merck (Darmstadt), 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoat), 2,2'-Dithiodipyridin, Jodacetamid, Phenylmethylsulfonylfluorid und p-Nitrophenylacetat von der Firma Serva (Heidelberg).

NaBD_4 (98 Mol% D), CDCl_3 (100%) lieferte Merck, Sharp & Dohme (München) und D_6 -Äthanol die Firma Roth (Karlsruhe).

Radiochemikalien wie NaB^3H_4 , $^3\text{H}_2\text{O}$, $[^3\text{H}]$ Acetanhydrid, $[^3\text{H}]$ -Acetyl-CoA, $[^3\text{H}]$ Oleoyl-CoA und $[^{14}\text{C}$ -Methyl] S-Adenosylmethionin wurden von der Firma Amersham/Buchler (Braunschweig) bezogen. Herrn L. Andert danke ich für die Synthese von $[1',-^{14}\text{C}]$ Tryptamin.

ACA 54 und HA-Sepharose lieferte die Firma LKB (Bromma, Schweden), Sephadex G-100 und Phenyl-Sepharose die Firma Pharmacia (Uppsala, Schweden). DEAE-Cellulose DE 52 stammte von der Firma Whatman Biochemicals (Springfield Mill, USA) und Matrex green von Amicon (Witten/Ruhr). Alle verwendeten Biochemikalien lieferte die Firma Boehringer (Mannheim).

Referenzalkaloide, die teilweise auch für Synthesen verwendet wurden, stammten von Dr. N.Neuss (Indianapolis, USA), Prof. S.Sakai (Chiba, Japan), Prof. G.N.Smith (Manchester, GB), Prof. E.Winterfeldt (Hannover) und Dr. Zeugner und Dr. Kehrbach (Hannover).

3. Geräte

Massenspektren wurden mit einem Finnigan MAT 44S oder einem MAT 111 mit Elektronenionisation (70 eV) aufgenommen. UV-Spektren wurden in Methanol an einem 551S UV/VIS Spektrometer der Firma Perkin-Elmer gemessen. Die optische Drehung wurde mit einem Perkin-Elmer Polarimeter 241 in einer 1 ml Küvette mit CHCl_3 als Lösungsmittel bestimmt. Die Registrierung von Infrarotspektren erfolgte als KBr-Pressling mit dem IR Gitterspektrometer 257 der Firma Perkin-Elmer. Für die Messung von ^1H -NMR-Spektren wurden die Instrumente WP 200 und WM 500 der Firma Bruker verwendet.

Zur Proteinreinigung diente eine Chromatographiestation der Firma LKB bestehend aus Multirac, Uvicord S II, Microperplex Peristaltic Pump, Ultrograd und Copper Bar Recorder.

B. Methoden

1. Synthesen

1.1. Synthese von [^3H -Aryl] Geissoschizin

Eine verbreitete Methode zur radioaktiven Markierung von Molekülen ist der Austausch von aromatischen Protonen durch ^3H in saurem Milieu. Diese Technik hat gegenüber anderen Synthesen den Vorteil, daß die Reaktionsbedingungen sehr milde sind und die Reaktion schnell und ohne Nebenprodukte abläuft. Für die Modifizierung von Geissoschizin und 10-Deoxysarpagin wurde die Methode nach MUCCINO und SERICO (1978) angewandt.

Die Synthese erfolgte in zwei Spitzkolben mit Außenschliff, die durch ein Bogenrohr mit Auslaßhahn verbunden waren. In Kolben 1 wurden 10 mg Geissoschizin (28.6 μMol) eingewogen, in Kolben 2 wurden unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff zuerst 0.5 ml frisch destilliertes Acetylchlorid (7 mMol) und darüber 0.25 ml $^3\text{H}_2\text{O}$ (14 mMol, 1.25 Ci) eingefroren. Beide Kolben wurden dann am Bogenrohr befestigt und nach 1 Stunde Reaktion bei Raumtemperatur Kolben 2 erneut mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Nach Evakuieren des Bogenrohres und Kühlen von Kolben 1 sublimierte das Reaktionsgemisch dann in dieses Gefäß. Die Apparatur wurde mit Stickstoff belüftet und der Inhalt von Kolben 1 für 14 Stunden bei 0°C im Dunkeln gerührt. Nach Entfernen des $\text{CH}_3\text{COO}^3\text{H}/^3\text{HCl}$ -Gemisches durch Rücksublimation in Kolben 2 wurde das Geissoschizin in Methanol aufgenommen und dünnschichtchromatographisch gereinigt (Fließmittelsystem A, II.B.2.1.). Die spezifische Aktivität des Produktes betrug 93.3 mCi/mMol bei einer Ausbeute von 36.5%.

Nach derselben Methode wurde 10-Deoxysarpagin radioaktiv mar-

kiert. Die spezifische Aktivität betrug 128.7 mCi/mMol, die Ausbeute 20%.

1.2. Synthese von [^3H -Aryl] Quebrachidin

Während die Synthese nach MUCCINO und SERICO beim Geissoschizinin und 10-Deoxysarpagin zum Austausch aller aromatischen Protonen führt, wie Vorversuche mit D_2O gezeigt hatten, konnte bei Alkaloiden des Ajmalin-Typs keine Inkorporation von Deuterium festgestellt werden. Um bei diesen Alkaloiden eine radioaktive Modifizierung zu erreichen, wurde deshalb die etwas drastischere Methode nach BARTON et al. (1967) verwendet.

Hierzu wurden in ein einseitig zugeschmolzenes Glasrohr (1.0 x 15.0 cm) 1 mg Quebrachidin (2.8 μMol) eingewogen und darüber unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff 5 μl Thionylchlorid (70 μMol) und 50 μl $^3\text{H}_2\text{O}$ (2.8 mMol, 75 mCi) eingefroren. Nach Zuschmelzen des Glasrohres erfolgte eine 48stündige Inkubation bei 100°C im Trockenschrank. Das Reaktionsgefäß wurde dann abgekühlt, geöffnet und der Inhalt mit einer 20%igen Na_2CO_3 -Lösung neutralisiert. Durch dreimaliges Ausschütteln mit Essigester konnte das markierte Quebrachidin isoliert werden. Es war dünnschichtchromatographisch einheitlich bei einer spezifischen Aktivität von 677.9 mCi/mMol und einer Ausbeute von 82.7%.

1.3. Synthese von [^3H -Methyl] Yohimbin und [^3H -Methyl] - Catharanthin

In Anlehnung an die Vorschrift von STÖCKIGT und KLISCHIES (1977) wurden je 1 mg Yohimbinsäure und Catharanthinsäure in 50 μl trockenem Dimethylformamid gelöst, nach Hinzugabe von 20 μl $^3\text{H}_2\text{O}$ 15 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen und mit einem Überschuß Diazomethan methyliert. Nach einer Reaktionszeit von 14 Stunden wurde mit 5 μl Essigsäure angesäuert,

um das nicht umgesetzte Diazomethan zu zerstören und anschließend mit Essigester extrahiert. Die Reinigung der Reaktionsprodukte erfolgte durch Dünnschichtchromatographie (Fließmittelsystem C, II.B.2.1.). Für [^3H -Methyl] Yohimbin ergab sich eine spezifische Aktivität von 2.1 mCi/mMol bei einer Alkaloidausbeute von 50% und für [^3H -Methyl] Catharanthin eine spezifische Aktivität von 5.5 mCi/mMol bei einer Ausbeute von 20%. Für die Synthese der verwendeten Alkaloidsäuren durch alkalische Hydrolyse der entsprechenden Alkaloide danke ich Frau B.Krausch.

1.4. Synthese von [^3H -Acetyl] Acetyltetraphyllicin

Als Modellverbindung zum Aufbau eines Aktivitätstestes für Enzyme, die Acetylgruppen von Alkaloiden des Ajmalin-Typs abspalten, wurde Acetyltetraphyllicin ausgewählt. Um auch kleinste Mengen der freigesetzten Essigsäure nachweisen zu können, wurde eine ^3H -markierte Acetylgruppe in das Tetraphyllicin eingeführt. Die verwendete Synthese basiert auf der EINHORN-Variante der SCHOTTEN-BAUMANN-Reaktion und wurde in einer evakuierbaren Apparatur durchgeführt.

An einem Bogenrohr wurde ein nach unten verjüngtes Reagenzglas mit Außenschliff befestigt, in dem sich eine Lösung von 15.4 mg Tetraphyllicin (50 μMol) in trockenem Pyridin befand. An der anderen Öffnung des Bogenrohres hing eine Ampulle mit 25 mCi [^3H] Acetanhydrid (500 mCi/mMol). Das Reagenzglas wurde durch Eintauchen in flüssigem Stickstoff gekühlt und die Apparatur 20 Minuten mittels einer Ölpumpe auf 0.1 Torr evakuiert. Dann wurde die zugeschmolzene Öffnung der Ampulle durch eine Metallkugel, die sich schon in dem Bogenrohr befand und mit Hilfe eines Magneten von außen bewegt werden konnte, zerschlagen und der Inhalt der Ampulle in das Reagenzglas übergefroren. Nach 16 Stunden Reaktionszeit wurde die Ampulle durch ein Reagenzglas mit Außenschliff ersetzt und das Gemisch aus Acetanhydrid, Essigsäure und Pyridin in dieses Glas zurücksublimiert. Der trockene Rückstand im Re-

aktionsgefäß wurde in Methanol aufgenommen und dünn-schicht-chromatographisch gereinigt (Fließmittelsystem A, II.B.2.1.). Die spezifische Aktivität des [^3H -Acetyl]Acetyltetraphyllins betrug 457.8 mCi/mMol bei einer Ausbeute von 2.9%.

1.5. Synthese von Polyneuridinaldehyd aus Quebrachidin

Für die Herstellung von Polyneuridinaldehyd aus Quebrachidin wurde die Vorschrift von BARTLETT et al. (1961) zur Synthese von Deoxyajmalal A aus 2l-Deoxyajmalin angewandt (Abb. 8). Diese Methode, eine Oxidation mit Bleitetraacetat in einem unpolaren Lösungsmittel, findet schon seit langem Verwendung in der Naturstoffchemie. So konnte WOODWARD (1956) durch diese Oxidation die Lage der C-7, C-17 Bindung im Ajmalinskelett klären.

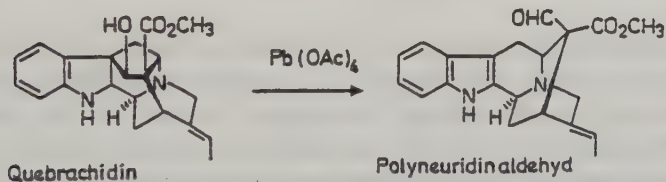


Abb. 8: Synthese von Polyneuridinaldehyd aus Quebrachidin

Es wurden 10 mg Quebrachidin (28.4 μ Mol) in 3 ml Benzol unter Rühren suspendiert und 12.6 mg Bleitetraacetat (28.4 μ Mol) portionsweise innerhalb von 3 Minuten zugegeben. Die Benzollösung wurde dann zweimal mit 5 ml H₂O, einmal mit 0.1 N NaOH und anschließend noch einmal mit 5 ml H₂O extrahiert, um Bleisalze und Essigsäure zu entfernen. Nach dünnsschichtchromatographischer Reinigung (Fließmittelsystem A, II.B.2.1.) ergab sich eine Ausbeute von 33.5%.

Spektroskopische Daten:

UV λ_{max} : 288 nm, 272 nm, 225 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 350 (M^+ , 39), 321 (31), 249 (99), 182 (33),
168 (100), 154 (20).

Reduktion mit NaBH_4 (II.B.1.9) führte zu dem entsprechenden Alkohol.

Dieselbe Synthese wurde zur Herstellung von [^3H -Aryl] Polyneuridinaldehyd verwendet. Hierzu wurden 11.4 μMol [^3H -Aryl] Quebrachidin (40 mCi/mMol) mit der gleichen Menge Bleitetraacetat in 1.5 ml Benzol umgesetzt. Das Produkt konnte mit einer guten Ausbeute (70%) erhalten werden, allerdings betrug die spezifische Aktivität nur 5.1 mCi/mMol. Dies ist sicherlich auf einen Protonenaustausch während der Reaktion zurückzuführen.

1.6. Synthese von Vinorin aus Acetyltetraphyllicin

Bleitetraacetatoxidation von 17-O-Acetyljalmalanverbindungen führt nicht zu einer Ringöffnung, sondern zu einer 4_1 -Verbindung und ermöglicht so den chemischen Zugang zu Alkaloiden des Indolenin-Typs. Die im folgenden verwendete Methode geht auf die Synthese des Vinorins nach KIANG et al. (1966) zurück (Abb. 9).

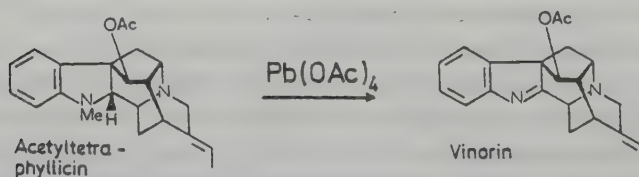


Abb. 9: Synthese von Vinorin aus Acetyltetraphyllicin

5.6 mg Acetyltetraphyllicin (16 μMol) wurden in 1 ml Benzol gelöst und unter Rühren ein vierfacher Überschuß an Bleitetra-

acetat hinzugefügt. Nach 1 Stunde Reaktionszeit erfolgte eine zweimalige Extraktion mit 5 ml H_2O . Die organische Phase wurde eingengt, in Methanol aufgenommen und auf Kieselgelplatten chromatographiert (Fließmittelsystem B, II.B.2.1.). Die Ausbeute betrug 14.5%.

Spektroskopische Daten:

UV λ_{max} : 266 nm, 220 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 334 (M^+ , 32), 291(51), 275(30), 182(32), 169(72), 168(100), 154(20).

Mit derselben Methode wurde [3H -Acetyl] Vinorin synthetisiert. 5.9 μ Mol [3H -Acetyl] Acetyltetraphyllicin (34 mCi/mMol) wurden mit 24 μ Mol Bleitetraacetat in 1 ml Benzol aufoxidiert. Nach Extraktion und dünnsschichtchromatographischer Reinigung ergab sich eine Ausbeute von 10%, spezifische Aktivität 31 mCi/mMol.

1.7. Synthese von Geissoschizal

Als Vorschrift für diese Synthese diente die Anleitung von RAPOPORT et al. (1960).

1.5 mg Geissoschizin (4.6 μ Mol) wurden in 0.5 ml 1 N HCl gelöst und 2 Stunden unter Stickstoffbegasung im Ölbad bei 120°C gekocht. Nach dem Abkühlen der Reaktionsmischung im Eis wurde mit 10% NH_4OH neutralisiert und mit CH_2Cl_2 ausgeschüttelt. Nach Reinigung auf Kieselgeldünnsschichtfolien (Fließmittelsystem A, II.B.2.1.) ergab sich eine Ausbeute von 27%.

Spektroskopische Daten:

UV λ_{max} : 289 nm, 280 nm, 273 nm, 220 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 294 (M^+ , 24), 293(29), 266(42), 251(55), 249(38), 171(74), 169(100), 156(54).

Reduktion mit $NaBH_4$ (II.B.1.9.) ergab Geissoschizol.

1.8. Oxidation von Alkaloiden mit primärer Alkoholgruppe zu den entsprechenden Aldehyden

Als geeignete Oxidationsmethode für Alkaloide mit Hydroxylgruppen erwies sich die Synthese nach COREY und KIM (1972), da einerseits die Bedingungen sehr milde sind, andererseits die Reaktion ohne Nebenprodukte abläuft.

Für die Herstellung von Voachalotinaldehyd wurden 80 mg N-Chlorsuccinimid (0.6 mMol) in 2 ml trockenem Toluol 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abfiltrieren des ungelösten N-Chlorsuccinimid wurde die Lösung auf 0°C abgekühlt und 60 µl (CH₃)₂S (0.82 mMol) zugegeben. Es bildete sich ein weißer Niederschlag. Dieses Reaktionsgemisch wurde dann im Kältebad (CCl₄, Trockeneis) auf -25°C temperiert und unter Rühren 3 mg Voachalotin (8.2 µMol) in 0.3 ml Toluol hinzugefügt. Nach 2 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Triäthylamin beendet. Das Reaktionsgemisch wurde mit 2 ml H₂O und 2 ml Äther versetzt, extrahiert und die organische Phase nach dem Einengen auf Kieselgelplatten gereinigt (Fließmittelsystem A, II.B.2.1.). Die Ausbeute betrug 86%.
Spektroskopische Daten:

UV $\lambda_{\max}$: 280 nm, 225 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 364(M⁺, 30), 349(10), 335(22), 305(70),
263(80), 183(100), 167(38).

Nach derselben Methode wurden synthetisiert:

Akuammidinaldehyd

Ausbeute: 25%

Spektroskopische Daten:

UV $\lambda_{\max}$: 288 nm, 272 nm, 223 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 350(M⁺, 16), 321(16), 249(48), 182(24),
169(100), 156(22), 154(24).

Anthirinaldehyd

Ausbeute: 10%

Spektroskopische Daten:

UV λ_{max} : 290 nm, 280 nm, 220 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 294 (M^+ , 50), 293 (40), 279 (10), 225 (80),
223 (100), 169 (25), 156 (20).

1.9. Reduktion mit NaBH_4

Die Reduktion erfolgte in methanolischer Lösung mit einem Überschuß von NaBH_4 . Nach 2-14 Stunden wurde der Ansatz mit H_2O verdünnt und mit Essigester extrahiert. Die organische Phase wurde dann chromatographisch gereinigt.

1.10. Acetylierung mit Acetanhydrid

Acetylierungen wurden standardmäßig mit einem Gemisch aus Acetanhydrid/abs. Pyridin = 1/1 durchgeführt. Nach 12 Stunden wurde die Reaktion abgebrochen und die Produkte chromatographisch getrennt.

2. Chromatographische Methoden

2.1. Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung von Alkaloiden erfolgte auf Kieselgel DC-Fertigplatten Polygram Sil G/UV₂₅₄ der Firma Macherey und Nagel bei Kammersättigung.

Folgende Fließmittelsysteme wurden verwendet:

A: Chloroform/Methanol/Ammoniak	= 9/1/0.01
B: Aceton/Petroläther/Diäthylamin	= 2/7/1
C: Xylol/n-Hexan/Äthylacetat/Äther	= 2/2/1/5
D: Äthylacetat/Äther/n-Hexan	= 2/2/1
E: Aceton/Petroläther/Diäthylamin	= 2/6/2
F: Xylol/Äther/Diäthylamin	= 7/3.5/0.5
G: Äthanol/Äthylacetat/Diäthylamin/Dimethyl- formamid	= 6/3/0.5/2
H: Aceton/Methanol/Essigsäure	= 7/2.5/0.5
I: n-Butanol/Essigsäure/Wasser	= 1/1/0.1

2.2. Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie

Um den enzymatischen Umsatz von nicht radioaktiv markierten Substanzen quantitativ zu erfassen, wurde die hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC) verwendet. Als Beispiel sei hier die Bildung von Vellosoimin aus Akuammidinaldehyd durch die Polyneuridinaldehyd-Esterase erläutert.

Gerät: Spectra-Physics SP 87 000
 Säule: Hibar Lichro Cart RP 18 (0.4 x 25 cm),
 10 µm Korngröße
 Fließmittel: 10 mM (NH₄)₂CO₃/Acetonitril = 1/1
 Flußrate: 1 ml/min
 Detektion: OD 280 nm

Je 30 nMol Akuammidinaldehyd wurden in 0.2 ml Ansatzvolumen (in 50 mM Phosphatpuffer pH 7, 10 mM MSH) mit 0, 8.5, 17.0, 42.5, 85.0 und 170.0 pkat Polyneuridinaldehyd-Esterase (16.9 nkat/mg Protein) für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze mit je 0.3 ml Essigester extrahiert und 20 µl der organischen Phase auf der RP 18 Säule aufgetrennt. Abbildung 10 zeigt das Elutionsprofil des Inkubationsansatzes mit 17 pkat Enzym, auf Abbildung 11 ist die Auswertung dieser Proteinabhängigkeit dargestellt.

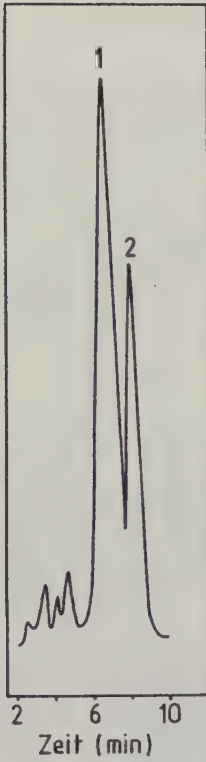


Abb. 10: Trennung von Akuammidinaldehyd (1) und Vellosimin (2) durch HPLC

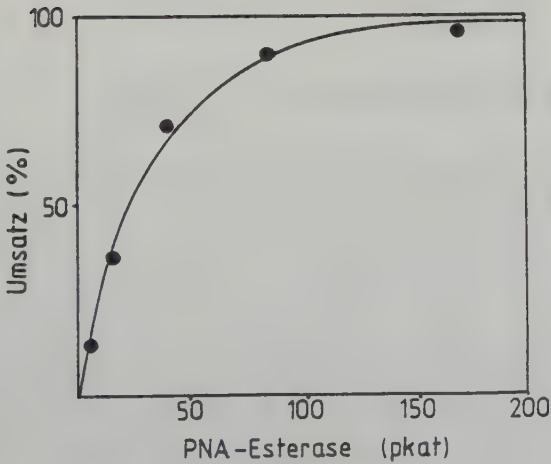


Abb. 11: Proteinabhängiger Umsatz von Akuammidinaldehyd zu Vellosimin

3. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration

Die Auftrennung von Proteinen bei der Gelfiltration beruht auf einer Verteilung der Moleküle zwischen Poren unterschiedlicher Größe. Deshalb ist die Elutionsgeschwindigkeit ein Maß für den Stoke'schen Radius des jeweiligen Proteins. Wenn man nun die Gelfiltrationssäule mit Proteinen eicht, deren Molekulargewicht bekannt ist, so kann man bei der Annahme einer globulären Struktur und gleicher Ladungsdichte aus der Wandlungsgeschwindigkeit des untersuchten Enzyms das Molekulargewicht berechnen (ANDREWS, 1964 und 1965).

Als Trennmedien für diese Messungen wurden Sephadex G-100 (40-120 μ m Korngröße) mit dem Fraktionierungsbereich 4 000-150 000 Dalton und Aca 54 mit dem Fraktionierungsbereich 5 000-70 000 Dalton für globuläre Proteine verwendet. Im folgenden ist die Versuchsanordnung für die Molekulargewichtsbestimmung mit einer Aca 54 Säule erläutert.

Säulenmaße:	2.3 x 92 cm
Flußrate:	20 ml/h
Probenvolumen:	5 ml (4% Glycerin)
Eichproteine:	5 mg Rinderserumalbumin MG 68 000
	5 mg Ovalbumin MG 45 000
	5 mg Trypsininhibitor MG 21 500
	(Sojabohne)
	5 mg Cytochrom c MG 12 500
Elutionspuffer:	50 mM Kaliumphosphat pH 7, 10 mM MSH

Abbildung 12 zeigt die Eichgerade sowie die Molekulargewichte der gemessenen Enzyme.

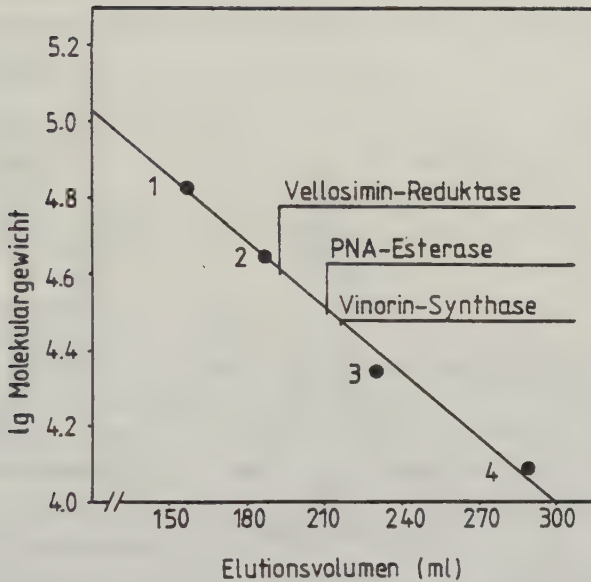


Abb. 12: Molekulargewichtsbestimmung an einer AcA 54 Gelfiltrationssäule

1: Rinderserumalbumin	MG 68 000
2: Ovalbumin	MG 45 000
3: Trypsininhibitor	MG 21 500
4: Cytochrom c	MG 12 500
Vellosimin-Reduktase	MG 41 700
PNA-Esterase	MG 32 400
Vinorin-Synthase	MG 30 500

4. Bestimmung des isoelektrischen Punktes durch Chromatofokussierung

Eine verbreitete Methode zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes eines Enzyms ist die isoelektrische Fokussierung. Hierbei wird die Probe zusammen mit einer Trägerampholyte in ein elektrisches Feld gebracht, was zur Folge hat, daß die Ampholyte einen pH-Gradienten ausbildet. Die Proteine wandern solange im elektrischen Feld, bis sie an der Stelle des pH-Gradienten angelangt sind, der ihrem isoelektrischen Punkt entspricht. Bei diesem pH-Wert liegen sie als Zwitter-

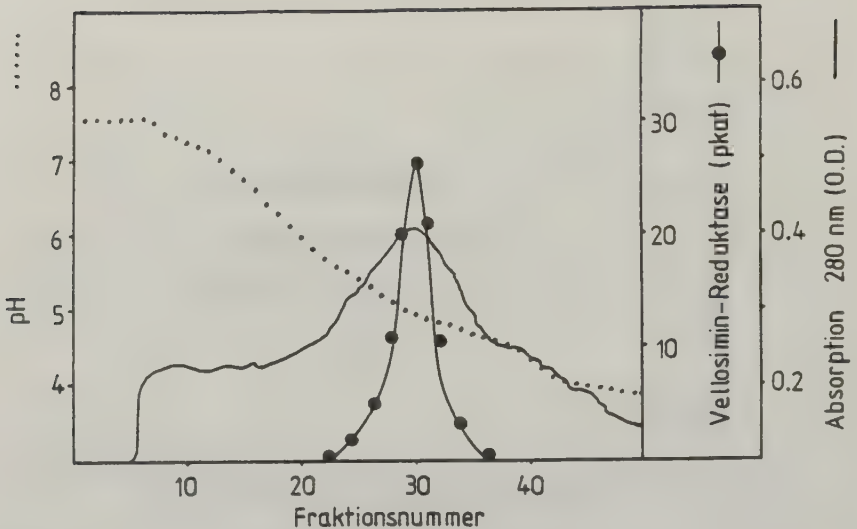


Abb. 13: Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Vellosoimin-Reduktase durch Chromatofokussierung

ionen vor, sind also elektrisch neutral. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch der hohe apparative Aufwand. Außerdem kommt es durch die lange Aufenthaltsdauer der Enzyme in starken elektrischen Feldern oft zu einer Denaturierung. Eine alternative Methode, die durch ihre Einfachheit und Schnelligkeit besticht, ist die Chromatofokussierung, die 1978 von SLUYTERMAN entwickelt wurde. Hierzu wird ein Anionenaustauscher mit einem Puffer äquilibriert, dessen pH-Wert alkalischer ist als der vermutete isoelektrische Punkt des untersuchten Proteins. Das Enzym wird mit demselben Puffer auf die Ionenaustauschersäule gepumpt und bindet aufgrund seiner Ladung. Dann wird mit einem sauren Puffer eluiert. Durch die Pufferwirkung des Ionenaustauschers bildet sich ein pH-Gradient innerhalb der Chromatographiesäule aus. Das Protein wird an seinem isoelektrischen Punkt eluiert. Voraussetzung für diese Methode ist ein Ionenaustauscher mit hoher Ladungsdichte und ein Puffersystem mit einem weiten Pufferbereich,

um einen linearen pH-Gradienten zu garantieren. Die im folgenden beschriebene Versuchsanordnung wurde für alle Experimente verwendet.

Säulenmaße:	0.27 x 17.5 cm
Säulenmaterial:	PBE 94 Ionenaustauscher, Pharmacia
Äquilibrationpuffer:	25 mM Imidazol-HCl pH 7.5, 10 mM MSH
Probenvolumen:	20 ml
(in Äquilibrationpuffer)	
Elutionspuffer:	PB 74-HCl pH 4.0 (1:8 verdünnt), Pharmacia
Flußrate:	13 ml/h

Abbildung 13 zeigt als Beispiel das Elutionsprofil der Vello-simin-Reduktase-Aktivität.

5. Quantitative Auswertung des Alkaloidgehaltes

Je 1 und 2 μ l einer methanolischen Lösung des jeweiligen Gewebeextraktes (Essigesterauszug) wurden auf Kieselgelfolien aufgetragen und in dem Fließmittelsystem B (II.B.2.1.) aufgetrennt. Die quantitative Auswertung erfolgte mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer KM 3 der Firma Zeiss durch Anregung bei 254 nm und Messung der Remission.

Die quantitative Bestimmung von Ajmalin in zellfreien Ansätzen wurde von Frau S. Mümmeler mit dem von ARENS (1979) entwickelten Radioimmuntest durchgeführt.

6. Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden nach BRADFORD (1976) durchgeführt. Als Standard zum Aufstellen einer Eichgerade diente Rinderse-
rumalbumin.

7. Radioaktivitätsmessung

Für die Radioaktivitätsbestimmung wurde ein Betaszint
BF 5 000 Szintillationszähler der Firma Berthold verwendet.
Die Messung erfolgte mit je 5 ml Quickszint der Firma Roth.
Das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis von doppelt markierten Verbindungen
wurde nach KLISCHIES (1977) bestimmt.

Die Auswertung von radioaktiven Dünnschichtchromatogrammen
erfolgte eindimensional mit einem LB 2722-2 Dünnschichtscan-
ner der Firma Berthold und zweidimensional mit einem LB 2722
Scanner versehen mit einem Punktdrucker.

8. Enzymtests

8.1. Strictosidin-Synthase

Die Strictosidin-Synthase-Aktivität wurde nach U.PFITZNER
und ZENK (1982) bestimmt. Für die Messung danke ich Frau
U.PFITZNER.

8.2. Unspezifische Esterasen

Für den quantitativen Nachweis unspezifischer Esterase-Aktivität wurde das synthetische Substrat p-Nitrophenylacetat benutzt. Die Bedingungen wurden wie folgt gewählt:

Substratkonzentration: 5 mM

Pufferkonzentration: 100 mM Kaliumphosphat pH 7.6

Volumen: 1 ml

Temperatur: 30°C

Nach Zugabe der Enzymlösung wurde die Zunahme der optischen Dichte bei 400 nm mit einem Zeiss PM Q2 Photometer laufend registriert. Die Umsatzrate wurde mit dem Extinktionskoeffizienten für p-Nitrophenol ($\epsilon_{400} = 1.8 \times 10^7 \text{ cm}^2/\text{Mol}$) berechnet.

Aktivitätsfärbung für unspezifische Esterasen nach Polyacrylamidgelelektrophorese wurde nach BLAICH (1978) durchgeführt.

5 mg β -Naphthylacetat und 2 mg Fast Blue wurden in 10 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 gelöst. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das jeweilige Gel 30 Minuten bei Raumtemperatur in dieser Lösung inkubiert. Das entstandene Naphthol reagiert mit dem Fast Blue unter Ausbildung eines wasserunlöslichen roten Azofarbstoffes. Proteinbanden mit Esterase-Aktivität werden durch rote Präzipitatbanden im Gel signalisiert.

9. Herstellung eines zellfreien Rohextraktes nach U. SEIPEL (1979)

Eingefrorenes Gewebe (100 g) wurde mit der doppelten Menge 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.5, 10 mM MSH bei Raumtemperatur solange gerührt, bis das Gewebe aufgetaut war (30 min). Dann wurde die Gewebemasse durch 4 Lagen Mull gedrückt und

der Preßsaft 20 Minuten bei 20 000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde im Eis durch portionsweise Zugabe von festem Ammoniumsulfat auf eine Salzkonzentration von 70% eingestellt. Nach 15 Minuten Rühren erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (15 min, 48 000 x g). Das Sediment wurde in einem möglichst kleinen Volumen des Aufschlußpuffers (5-10 ml) suspendiert und die Lösung durch erneute Zentrifugation (5 min, 48 000 x g) geklärt. Zur Entsalzung und zur Entfernung von Phenolen und Alkaloiden wurde dieser Proteinrohextrakt dann über eine G-25 Säule (2 x 30 cm) gegeben, wobei der oben genannte Puffer zur Elution diente.

10. Aufschluß von differenzierten Pflanzen

Je 10 g Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einer mit Stickstoff gekühlten Analysenmühle zu einem feinen Gewebepulver zermahlen. Dieses wurde dann mit je 20 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.5, 10 mM MSH 30 Minuten bei Zimmertemperatur gerührt und durch 4 Lagen Mull gepreßt. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (20 min, 20 000 x g) und aus dem Überstand die Proteine durch Zugabe von Ammoniumsulfat (70% Endkonzentration) ausgefällt. Nach Zentrifugation (15 min, 48 000 x g) wurde der Niederschlag in 5 ml des Aufschlußpuffers aufgenommen und 12 Stunden bei 4°C gegen 5 l desselben Puffers dialysiert.

III. E R G E B N I S S E

A. Untersuchungen zur Bedeutung des Geissoschizins für die Biosynthese der Heteroyohimbin-Typ Alkaloide in *Catharanthus roseus*

Die von SCOTT et al. (1975) und von STÖCKIGT (1978) aufgestellten Hypothesen über den Einbau von Geissoschizin in Heteroyohimbin-Typ Alkaloide unterscheiden sich hauptsächlich durch das von STÖCKIGT geforderte Zwischenprodukt 4,21-Dehydrogeissoschizin. Die Beteiligung dieses Intermediats an der Reaktion erfordert aber den zwischenzeitlichen Ausbau eines der beiden Wasserstoffatome am C-21 des Geissoschizins. Ein solcher Oxidationsschritt läßt sich dadurch nachweisen, daß man diese Wasserstoffatome durch eines ihrer Isotope (Deuterium oder Tritium) ersetzt. Der Verlust von Deuterium kann dann im Endprodukt massenspektroskopisch nachgewiesen werden, der Ausbau von Tritium zeigt sich in einer Verminderung der spezifischen Radioaktivität des Produktes. Durch die Arbeiten von KAN-FAN et al. (1979), die 4,21-Dehydrogeissoschizin aus Guettarda eximia isoliert hatten, war diese Verbindung für chemische Synthesen zugänglich. Es wurde deshalb versucht, durch Reduktion der 4,21-Doppelbindung mit NaBD_4 oder NaB^3H_4 das gewünschte Wasserstoffisotop in die 21-Position des Geissoschizins einzuführen.

1. Experimente mit [21-D] Geissoschizin

1.1. Synthese von [21-D] Geissoschizin aus 4,21-Dehydrogeissoschizin

50 mg 4,21-Dehydrogeissoschizin (143 μMol) wurden in 35 ml Methanol bei -30°C durch Zugabe von 4.5 mg NaBD_4 (112 μMol)

reduziert. Nach 1 Stunde Reaktionszeit wurde der Ansatz eingengt und dünnenschichtchromatographisch gereinigt (Fließmittelsystem A, II.B.2.1.). Die Ausbeute der Reaktion betrug 15%.

Massenspektroskopische Daten:

MS m/z (rel. Int. %): 353(M^+ , 70), 352(M^+-H , 65), 338(M^+-CH_3 , 16), 324(35), 252(75), 250(100), 185(31), 184(32), 171(60), 169(95), 156(75).

Zum Vergleich die massenspektroskopischen Daten von Geissoschizin:

MS m/z (rel. Int. %): 352(M^+ , 64), 351(M^+-H , 34), 337(M^+-CH_3 , 43), 323(45), 251(100), 249(98), 185(5), 184(25), 171(68), 169(93), 156(59).

Massenspektroskopisch ($M^+ = 353$) zeigt sich eindeutig der Einbau von einem Atom D pro Molekül Geissoschizin. Eine 1H -NMR-Analyse dieses Syntheseproduktes ergab kein Signal für ein 21α -Proton bei 2.72 ppm, sondern nur für ein 21β -Proton (3.1 ppm), welches keine geminale Kopplung aufwies. Borhydridreduktion von 4,21-Dehydrogeissoschizin führt also zu der stereospezifischen Übertragung eines Hydridions in die 21α -Position von Geissoschizin (STÖCKIGT, HÖFLE und PFITZNER, 1980).

1.2. Zellfreier Umsatz von [21 α -D] Geissoschizin zu Alkaloiden der Heteroyohimbin-Gruppe

Um die Beteiligung eines 4,21-Dehydrozwischenproduktes an der enzymatischen Umsetzung von Geissoschizin zu den Heteroyohimbin-Typ Alkaloiden zu demonstrieren, wurde das von STÖCKIGT (1978) beschriebene Enzymsystem aus C. roseus verwendet. Der Proteinrohextrakt wurde wie unter II.B.9. hergestellt.

1 ml Rohextrakt wurde mit 10 mg NADPH, 10 mg $NADP^+$ und 4.2 mg [21 α -D] Geissoschizin in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 (Gesamtvolumen 5 ml) für 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Dann erfolgte eine Extraktion mit Äther. In dem Fließmittel-

system D (II.B.2.1.) wurde das Substrat von den drei Reaktionsprodukten abgetrennt und die Massenspektren der isolierten Substanzen gemessen.

Ajmalicin:

MS m/z (rel. Int. %): 352(M^+ , 100), 351(71), 209(14), 184(35),
169(11), 156(50).

19-epi-Ajmalicin:

MS m/z (rel. Int. %): 352(M^+ , 100), 351(85), 223(18), 222(19),
184(34), 169(28), 156(70).

Tetrahydroalstonin:

MS m/z (rel. Int. %): 352(M^+ , 100), 351(84), 337(20), 223(38),
209(23), 184(22), 169(28), 156(54).

Das reisolierte [21 α -D] Geissoschizin war massenspektroskopisch identisch mit dem Ausgangsprodukt. Das Massenspektrum der isolierten Enzymprodukte beweist, daß das Deuteriumatom in der 21 α -Position durch ein Proton ersetzt worden ist. Hinzu kommt, daß dieser Ausbau stereospezifisch erfolgen muß, denn bei einem rein statistischen Umsatz, an dem der 21 α - und der 21 β -Wasserstoff gleichermaßen beteiligt wären, kann man nur einen Deuteriumverlust von maximal 50% erwarten. Abbildung 14 erläutert den Deuteriumausbau an einem Formelschema.

2. In vivo und in vitro Experimente mit [5- 14 C, 21 α - 3 H]-Geissoschizin

Zur genauen Quantifizierung und vor allem zur Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse in vivo war es notwendig, [21 α - 3 H]-Geissoschizin zu synthetisieren. Um gleichzeitig ein internes Maß für die Einbaurrate des Kohlenstoffskelettes in die jeweilige Verbindung zu haben, wurde zusätzlich eine 14 C-Markierung in die C-5 Position des Geissoschizins eingeführt.

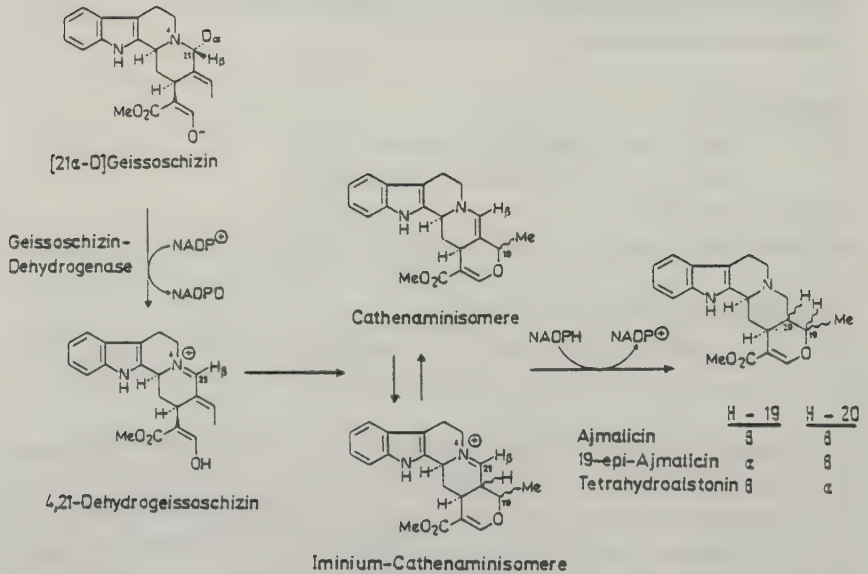


Abb. 14: Umsatz von [21α-D]Geissoschizine mit einem Enzymrohextrakt isoliert aus C. roseus Zellkulturen

2.1. Synthese von doppelt markiertem Geissoschizine

Die entwickelte Synthese beruht auf der Möglichkeit, mit einem Rohextrakt aus C. roseus Zellkulturen Cathenamin aus den Vorstufen Tryptamin und Secologanin zu bilden. Cathenamin kann dann in saurem Milieu (KAN-FAN und HUSSON, 1979) in 4,21-Dehydrogeissoschizine überführt und dann mit NaBH₄ reduziert werden.

Zur enzymatischen Produktion von [5-¹⁴C] Cathenamin wurden 2.5 ml Rohextrakt (II.B.9.) mit 11 μMol [1'-¹⁴C] Tryptamin (80.2 μCi) und 50 μMol Secologanin in 7.5 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 bei 30°C für 2 Stunden inkubiert. Der Ansatz wurde mit Äther extrahiert und die Alkaloide dann mit 1 N HCl ausgeschüttelt. Nach dem Entfernen der Salzsäure

durch Gefriertrocknung wurde das entstandene 4,21-Dehydro-geissoschizin in Methanol aufgenommen, mit NaB^3H_4 reduziert und gereinigt wie unter III.A.1.1. erläutert. Die Ausbeute betrug 13.3% bezogen auf das eingesetzte $[\text{}^{14}\text{C}]$ Tryptamin, das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis betrug 7.5/1.

2.2. Inkubation des doppelt markierten Geissoschizins mit einer Enzympräparation aus C. roseus Zellkulturen

43 nMol $[\text{}^5\text{}^{14}\text{C}, 21\alpha\text{}^3\text{H}]$ Geissoschizin ($2.1 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$, $0.28 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$) wurden mit 0.8 ml Rohextrakt (8 mg Protein), 2 mg NADP^+ und 2 mg NADPH in 1.5 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 zu den drei Alkaloiden Ajmalicin, 19-epi-Ajmalicin und Tetrahydroalstonin umgesetzt. Die Aufarbeitung der Inkubationsmischung erfolgte wie unter III.A.1.2. beschrieben. Tabelle 1 zeigt die Resultate dieses Experiments.

Alkaloid	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	% Ausbau ^3H
Geissoschizin	7.50/1	0
Ajmalicin	0.35/1	95
19-epi-Ajmalicin	0.54/1	93
Tetrahydroalstonin	0.47/1	94

Tab. 1: ^3H -Ausbau beim Umsatz von $[\text{}^5\text{}^{14}\text{C}, 21\alpha\text{}^3\text{H}]$ Geissoschizin zu Alkaloiden des Heteroyonimbins-Typs

Auch bei Verwendung von doppelt markiertem Geissoschizin spricht die hohe Ausbaurate des Tritiums für einen stereospezifischen Ausbau des 21α -Protons.

2.3. Fütterungsexperimente an C. roseus Pflanzen

Um die physiologische Relevanz dieser in vitro Experimente zu untersuchen, wurde doppelt markiertes Geissoschizin an intakte Pflanzen verfüttert. Als Versuchsmaterial dienten 6 Wochen alte Keimlinge von C. roseus, die angezogen wurden wie unter II.A.1.1. dargestellt.

Je 330 nMol [$5\text{-}^{14}\text{C}, 21\alpha\text{-}^3\text{H}$]Geissoschizin ($17.6\text{ }\mu\text{Ci }^3\text{H}$, $3.07\text{ }\mu\text{Ci }^{14}\text{C}$) wurden in $10\text{ }\mu\text{l}$ DMSO aufgenommen und dann $0.5\text{ ml H}_2\text{O}$ hinzugegeben. Diese Lösung wurde an das Wurzelsystem von je zwei Keimlingen appliziert. Nach 8 Stunden war die Flüssigkeit aufgenommen. Zur vollständigen Aufnahme der radioaktiven Vorstufe wurde noch zweimal je $0.5\text{ ml H}_2\text{O}$ nachgefüllt und dann nach 24 Stunden die Pflanze in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Alkaloide wurden durch Auskochen der Pflanzen mit 95%igen Äthanol extrahiert, wobei die Extraktionslösung 1 mg Ajmalicin enthielt, um Verluste während der Aufarbeitung möglichst gering zu halten. Die Reinigung des Ajmalicins erfolgte durch Chromatographie auf Kieselgelplatten (Fließmittelsysteme D und F, II.B.2.1.) und durch Umkristallisation aus Methanol. Es ergab sich eine Einbaurate von 0.1% (bezogen auf ^{14}C) bei einem $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis von $0.64/1$. Der Einbau von Geissoschizin in Ajmalicin erfolgt also in der intakten Pflanze nach dem gleichen Mechanismus wie in dem beschriebenen zellfreien System.

3. Geissoschizin-Dehydrogenase aus C. roseus Zellkulturen

Nachdem durch den Einsatz von stereospezifisch isotopenmarkierten Vorstufen die essentielle Bedeutung einer 21α -Dehydrierung beim Einschleusen von Geissoschizin in die Biosynthesesequenz der Heteroyohimbin-Typ Alkaloide gezeigt war, bot sich als abschließender Schritt zur Klärung dieses Problems die Anreicherung und Charakterisierung des beteiligten Enzyms an.

3.1. Enzymtest für die Geissoschizin-Dehydrogenase

Für die Reinigung eines Enzyms ist es zunächst notwendig, über einen quantitativen Nachweis der katalytischen Aktivität zu verfügen. Zum Aufbau eines solchen Enzymtests für die Geissoschizin-Dehydrogenase wurde die unterschiedliche Ladung von Substrat und Produkt bei stark alkalischem pH-Wert ausgenutzt. Während Geissoschizin bei diesen Bedingungen aufgrund der aciden Hydroxylgruppe als Anion vorliegt, zyklisiert 4,21-Dehydrogeissoschizin zum ungeladenen Cathenamin (KAN-FAN und HUSSON, 1979). Durch Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel können beide Substanzen getrennt werden.

Folgende Standardbedingungen erwiesen sich als geeignet:

In 0.2 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.6 wurden 0.12 nMol [^3H -Aryl] Geissoschizin (92.3 mCi/mMol) und 12.5 nMol NADP^+ zusammen mit der jeweiligen Enzympräparation 1 Stunde bei 30°C inkubiert. Dann wurden die Ansätze durch Zugabe von 0.1 ml 5 N KOH abgestoppt und 30 Minuten mit 0.5 ml Toluol extrahiert. Die Radioaktivität in der organischen Phase wurde bestimmt und als Maß für die Geissoschizin-Dehydrogenase-Aktivität genommen.

3.2. Anreicherung der Geissoschizin-Dehydrogenase aus C. roseus Zellkulturen

3.2.1. Gewebeaufschluß

Für die Reinigung der Geissoschizin-Dehydrogenase wurden Zellsuspensionskulturen von C. roseus verwendet, die in LS-Medium kultiviert und nach 7 Tagen abgeerntet wurden (II.A.1.2.). 320 g des gefrorenen Gewebes wurden aufgeschlossen (II.B.9.), der Rohextrakt durch Ultrafiltration (Berghof-Zelle) auf 260 ml konzentriert und 24 Stunden bei 4°C gegen 20 l 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 20 mM MSH dialysiert. Eine Salzfraktionierung wurde bei der Reinigung dieses Enzyms

vermieden, da Vorversuche eine bis zu 80%ige Inaktivierung bei diesem Schritt ergeben hatten.

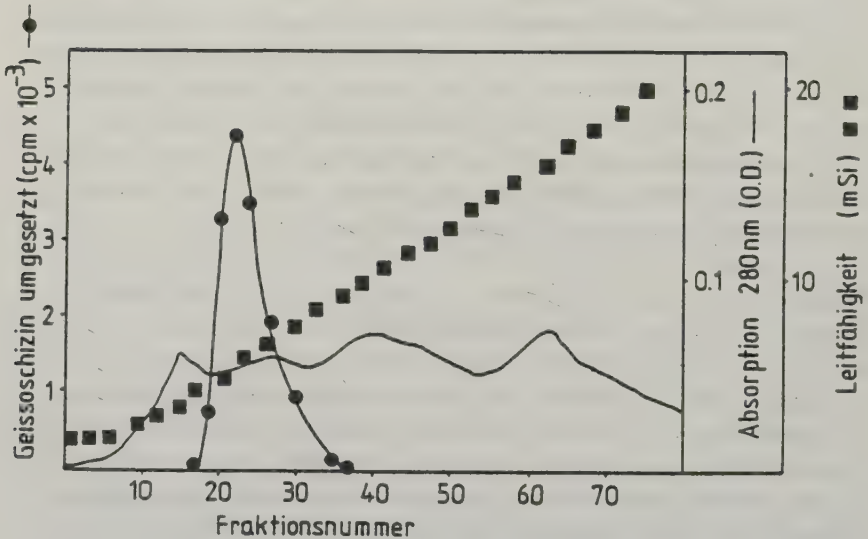


Abb. 15: Chromatographie der Geissoschizin-Dehydrogenase an DEAE-Cellulose

3.2.2. Chromatographie an DEAE-Cellulose

Eine Methode, die bei der Reinigung von Proteinen oft verwendet wird, ist die Ionenaustauscherchromatographie. Da der isoelektrische Punkt der meisten Proteine im sauren pH-Bereich liegt, finden häufig schwach basische Anionenaustauscher bei dieser Methode Anwendung. Bewährt haben sich dabei Ionenaustauscher mit einer Cellulosematrix aufgrund ihrer hohen Bindungskapazität.

Der dialysierte Rohextrakt wurde auf eine mit Diäthylamino-äthyl-Cellulose gefüllte Säule (2.5 x 7.5 cm) gepumpt und mit

Äquilibriumspuffer (10 mM Kaliumphosphat pH 7, 20 mM MSH) nachgewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-250 mM NaCl. Das Aktivitätsmaximum der Geissoschizin-Dehydrogenase wurde bei einer Salzkonzentration von 50 mM NaCl von der Säule eluiert. Alle aktiven Fraktionen (20-29) wurden vereinigt, auf ein Volumen von 5.5 ml eingengt und gegen 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 20 mM MSH dialysiert. Abbildung 15 zeigt das Elutionsprofil dieser Säulenchromatographie.

3.2.3. Gelfiltration an ACA 54

Ein weiteres Kriterium, nach dem Proteine fraktioniert werden können, ist die Molekülgröße. Als Trennmedien werden quervernetzte Polysaccharide benutzt, die über Poren unterschiedlicher Größe verfügen. Da kleinere Proteine in eine größere Anzahl von Poren eindringen, werden sie später von der Säule eluiert als größere Proteine. Bei dem verwendeten Gelfiltrationsmedium handelt es sich um Ultrogel ACA 54 der Firma LKB, einem Polymer bestehend aus 5% Acrylamid und 4% Agarose. Der Fraktionierungsbereich beträgt 5 000-70 000 Dalton für globuläre Proteine.

Das vereinigte DEAE-Eluat wurde mit 10% Glycerin versetzt und der Pufferüberstand einer ACA 54 Säule (2.5 x 84 cm) mit dieser Proteinlösung unterschichtet. Dann wurde mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 20 mM MSH eluiert (Flußrate 24 ml/h) und 100 Fraktionen zu 5 ml aufgefangen. Die Fraktionen 50-70 (100 ml) enthielten die Geissoschizin-Dehydrogenase-Aktivität und wurden vereinigt. Diese Enzympräparation enthielt keine Strictosidin-Synthase und keine Strictosidin-Glucosidasen. Dagegen konnte die Iminium-Cathenamin-Reduktase-Aktivität nicht vollständig abgetrennt werden.

Andere Reinigungsschritte als die erläuterten führten aufgrund der Instabilität dieses Enzyms bei hohen Ionenstärken und saurem pH-Wert zu einer Denaturierung. Tabelle 2 faßt die

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (pkat)	spez. Akt. (pkat/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (x-fach)
Rohextrakt	231	18.5	0.08	100	1.0
vereinigte DEAE-Cellulose Fraktionen	7.5	10.5	1.4	58	17.5
vereinigte ACA 54 Fraktionen	2.6	7.5	2.8	41	35.0

Tab. 2: Anreicherung der Geissoschizinin-Dehydrogenase aus C. roseus Suspensionskulturen

Daten zur Anreicherung der Geissoschizin-Dehydrogenase zusammen.

3.3. Charakterisierung der Geissoschizin-Dehydrogenase

Für die folgenden Experimente wurde die 35fach angereicherte Enzympräparation aus C. roseus verwendet.

3.3.1. pH-Abhängigkeit

Jedes Enzym zeigt in seiner Aktivität ein typisches pH-Optimum. Dies ist auf den pK-Wert der Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzyms und auf den Dissoziationszustand der Substratmoleküle zurückzuführen.

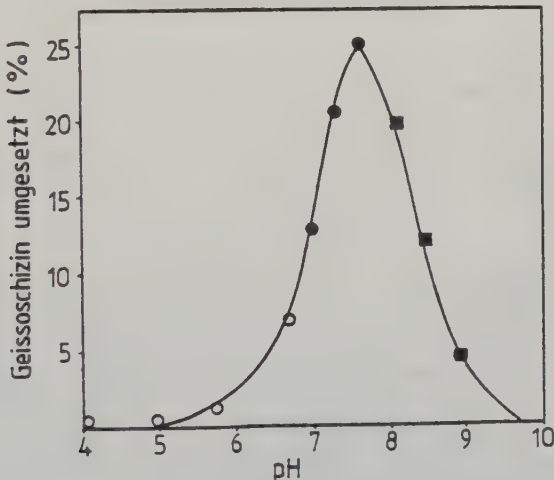


Abb. 16: pH-Abhängigkeit der Geissoschizin-Dehydrogenase
Je 0.1 ml Enzym (2.8 pkat/mg) wurden unter Standardbedingungen (III.A.3.1.) in Anwesenheit von 0.1 M Phosphat-Citrat-Puffer (○), 0.1 M Phosphat-Puffer (●) und 0.1 M Borat-Puffer (■) inkubiert.

Die Geissoschizin-Dehydrogenase-Reaktion zeigt ein Optimum bei pH 7.6 (Abb. 16).

3.3.2. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration

Das Molekulargewicht der Geissoschizin-Dehydrogenase wurde durch Gelfiltration bestimmt (II.B.3.).

Eine Sephadex G-100 Säule (1.6 x 95 cm), Trennbereich 4 000-150 000 Dalton, wurde mit 2 ml Probe beschickt und bei einer Flußrate von 10 ml/h mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 20 mM Mercaptoäthanol eluiert. Abbildung 17 zeigt die

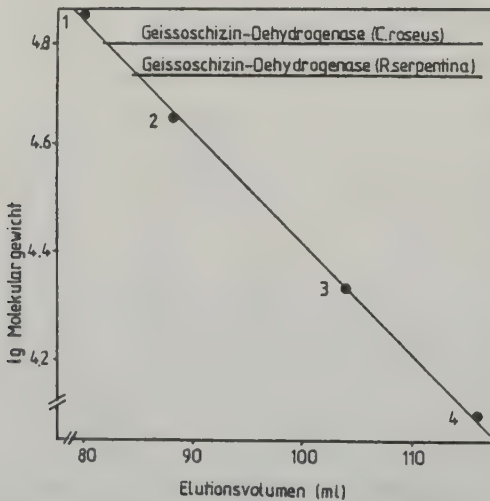


Abb. 17: Molekulargewichtsbestimmung der Geissoschizin-Dehydrogenase aus C. roseus und R. serpentina an G-100

1: Rinderserumalbumin	MG 68 000
2: Ovalbumin	MG 45 000
3: Trypsininhibitor (Sojabohne)	MG 21 500
4: Cytochrom c	MG 12 500
Geissoschizin-Dehydrogenase	
<u>C. roseus</u>	MG 60 000
<u>R. serpentina</u>	MG 53 000

Eichgeräde sowie die ermittelten Molekulargewichte für die Geissoschizin-Dehydrogenasen aus C. roseus und R. serpentina. Das Enzym aus C. roseus weist ein Molekulargewicht von $60\,000 \pm 10\%$ Dalton auf.

3.3.3. Einfluß der Substratkonzentration auf die Aktivität der Geissoschizin-Dehydrogenase

Zur Messung einer Geissoschizinabhängigkeit wurde dieses Substrat im Bereich von $5\text{--}85\ \mu\text{M}$ variiert. Jeder Inkubationsansatz enthielt $0.1\ \text{mg}$ Protein ($0.3\ \text{pkat}$) und $2\ \text{mM}$ NADP^+ . Alle anderen Parameter entsprachen den Standardtestbedingungen. Abbildung 18 zeigt die Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die jeweilige Substratkonzentration sowie eine reziproke Auswertung nach LINEWEAVER und BURK (1934). Die MICHAELIS-Konstante für Geissoschizin beträgt $83\ \mu\text{M}$ bei

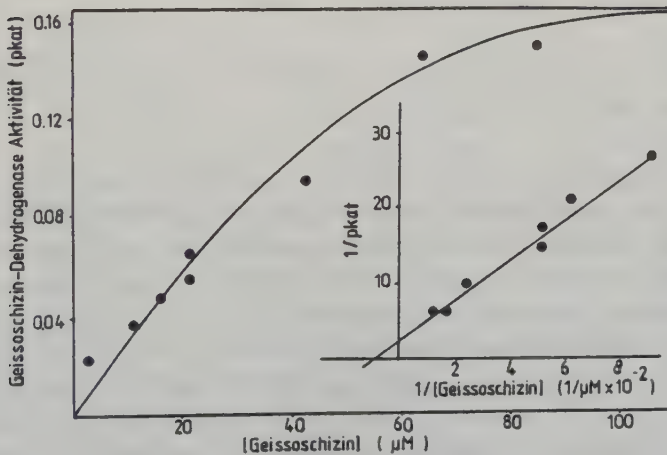


Abb. 18: Geissoschizinabhängigkeit der Geissoschizin-Dehydrogenase aus C. roseus
 K_m : $83\ \mu\text{M}$ V_{max} : $0.4\ \text{pkat}$

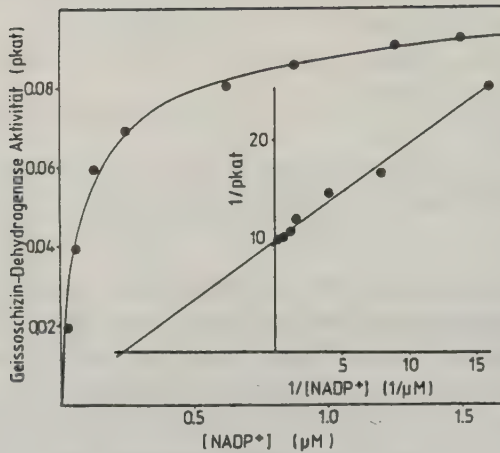


Abb. 19: NADP^+ -Abhängigkeit der Geissoschizin-Dehydrogenase
aus C. roseus
 K_m : 77 nM $V_{\max}$: 0.12 pkat

einer maximalen Umsatzrate von 0.4 pkat.

Andere Alkaloide wie $[21\alpha\text{-}^3\text{H}]$ Tetrahydroalstonin oder $[3\alpha\text{-}^3\text{H}]$ -Ajmalicin wurden nicht umgesetzt.

Auch für NADP^+ wurde eine Konzentrationsabhängigkeit angenommen. Bei einer konstanten Geissoschizinkonzentration (0.15 mM) wurde in Gegenwart von 60-1250 nM NADP^+ die Enzymaktivität der Geissoschizin-Dehydrogenase bestimmt. Abbildung 19 zeigt die graphische Auswertung dieses Experiments. Für NADP^+ konnte der erstaunlich kleine K_m -Wert von 77 nM bestimmt werden bei einer Maximalgeschwindigkeit von 0.12 pkat.

NAD^+ wird nicht als Cofaktor akzeptiert. Dieses Enzym ist also im Gegensatz zu der Iminium-Cathenamin-Reduktase-Aktivität (STÖCKIGT et al., 1976) äußerst spezifisch in Bezug auf das Cosubstrat.

B. Untersuchungen zur Biosynthese der Ajmalin/Sarpagin-Typ Alkaloide in Zellkulturen von *R. serpentina* ausgehend vom Geissoschizin

Als Untersuchungsobjekt zum Studium der Biosynthese von monoterpenoiden Indolalkaloiden des Ajmalin- und des Sarpagin-Typs wurde *R. serpentina* ausgewählt, weil die grundlegenden in vivo Einbauxperimente mit dieser Pflanze durchgeführt worden waren (siehe I.).

Zellsuspensionskulturen wurden 1978 von Frau El-Shagi aus Keimlingen von *R. serpentina* angelegt und in dem Flüssigmedium nach LINSMAIER und SKOOG (1965) angezogen (II.A.1.2.).

1. Bestimmung des Alkaloidgehaltes von *R. serpentina* Suspensionskulturen

Ein großer Vorteil von pflanzlichen Suspensionskulturen liegt darin, daß die Pflanzenzellen aufgrund ihres entdifferenzierten Zustandes mit den klassischen Methoden der Mikrobiologie in großen Mengen produziert werden können. Dadurch wird es möglich, genügend homogenes Material für biochemische Untersuchungen zu erhalten, was bei differenzierten Pflanzen nur unter größten Schwierigkeiten zu erreichen ist. Andererseits müssen aber Kulturbedingungen gefunden werden, die unabhängig von der morphologischen Differenzierung zu einer Ausprägung der gewünschten chemischen Eigenschaften führen (ZENK et al., 1977). Um sicher zu sein, daß bei der vorhandenen Suspensionskultur von *R. serpentina* die gewünschten Biosynthesesequenzen realisiert waren, wurde vor eine biochemische Bearbeitung die Bestimmung der Inhaltsstoffe dieser Zellen gestellt.

Nachdem Vorversuche mit Gewebe aus LS-Medium auf einen Alkaloidgehalt hingewiesen hatten, wurden *R. serpentina* Zellen in

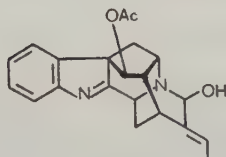
AP-Medium mit je 300 mg L-Tryptophan pro 1 Liter Medium kultiviert, um durch Hinzufügen dieser Vorstufe eine maximale Indolalkaloidausbeute zu erreichen. Hier konnte auf die Befunde von ARENS (1979) zurückgegriffen werden, der mit dieser Nährlösung eine 10fache Steigerung des Ajmalingehaltes in Zellkulturen von R. vomitoria erzielte.

Für die Isolierung der Indolalkaloide aus R. serpentina Zellsuspensionskulturen wurden 2 kg eingefrorenes Gewebe (127 g Trockengewicht) 24 Stunden mit 3 l Essigester extrahiert. Vorher wurden 200 ml 1 M Kaliumboratpuffer pH 8.5 zum Gewebe hinzugefügt, damit die Alkaloide als freie Basen vorlagen. Die organische Phase wurde auf 120 ml konzentriert und mit 100 ml 2% H_2SO_4 ausgeschüttelt. Danach wurde die Schwefelsäure mit KOH auf pH 9 eingestellt und die Alkaloide mit Chloroform extrahiert. Der Rückstand nach dem Eindampfen des Chloroforms wurde in 2 ml Methanol aufgenommen. Aus dieser Lösung kristallisierten bei $-20^{\circ}C$ 160 mg einer Substanz, die sich bei der spektroskopischen Charakterisierung als Vomilenin herausstellte. Die Mutterlauge wurde in 100 ml 1.7% Phosphorsäure aufgenommen und mit NH_4OH auf pH 3 eingestellt. Nach Extraktion mit Chloroform zur Entfernung von Verunreinigungen wurde der pH-Wert auf pH 5.7 erhöht und mit 200 ml Toluol/Äther = 7/3 ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde eingedampft und der Rückstand in Methanol aufgenommen. Aus dieser Lösung kristallisierten erneut 112 mg Vomilenin. Außerdem wurden dünnschichtchromatographisch aus der Mutterlauge Vinorin (2 mg) und 17-O-Acetylajmalin (0.9 mg) isoliert. Die wässrige Phase wurde nun bei einem pH-Wert von pH 9 mit Chloroform ausgezogen. Eine Aufarbeitung dieses Extraktes durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten führte zur Identifizierung von Reserpin (3 mg), 17-O-Acetylnorajmalin (4 mg), Ajmalin (8.5 mg), Yohimbin (0.7 mg) und Spuren von Ajmalicin, 3-Isoajmalicin, Velloimin und 10-Deoxysarpagin. Der nach dem Abdekantieren der Essigesterphase verbliebene Geweberückstand wurde zusätzlich mit 3 l Methanol gerührt, um polare Indolalkaloide in Lösung zu bringen. Eine dünnschichtchromatographische Reinigung des Methanolextrak-

tes lieferte die Substanzen Serpentin, Alstonin und Sarpagin, die ebenfalls nur als Spurenalkaloide auftraten. Für die Reinigung der Alkaloide aus R. serpentina auf Kieselgelfolien fanden die Fließmittelsysteme A-H (II.B.2.1.) Anwendung.

Die physikochemischen Eigenschaften der isolierten Alkaloide sind im folgenden zusammengefaßt.

Vomilenin



TAYLOR et al. (1962)

UV λ_{max} : 257 nm, 218 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 350(M^+ , 7), 183(7), 170(18), 169(100), 168(19).

IR ν_{max} (cm^{-1}): 2940, 1740, 1230, 1030.

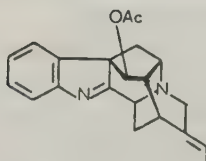
$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 7.64 (1H, d, H-12, J = 7.6 Hz), 7.46 (1H, d, H-9, J = 7.6 Hz), 7.42 (1H, t, H-11, J = 7.6 Hz), 7.24 (1H, t, H-10, J = 7.6 Hz), 5.74 (1H, q, H-19, J = 7.0 Hz), 5.03 (1H, br s, H-21), 4.98 (1H, s, H-17), 4.33 (1H, m, H-3), 3.95 (1H, br t, H-5), 3.28 (1H, m, H-15), 2.77 (1H, dd, $\beta\text{H-6}$, J_1 = 12 Hz, J_2 = 4.9 Hz), 2.42 (1H, br t, H-16), 2.17 (3H, s, OCOCH_3), 1.89 (2H, m, H_2 -14), 1.72 (1H, d, $\alpha\text{H-6}$, J = 13 Hz), 1.67 (3H, d, H_3 -18, J = 7 Hz).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -72° (c = 0.25%, Pyridin) [Lit.: -72°]

Schmp.: $196-204^\circ\text{C}$ [Lit.: 207°C]

Derivate: Acetylvomilenin

Vinorin



MEISEL et al. (1971)

UV $\lambda_{\max}$: 258 nm, 218 nm.

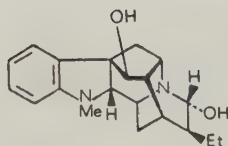
MS m/z (rel. Int. %): 334 (M^+ , 39), 333 (M^+-H , 20), 291 (63),
275 (35), 182 (33), 169 (74), 168 (100).

IR $\nu_{\max}$ (cm^{-1}): 2900, 1740, 1230, 1030, 800.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 7.62 (1H, d, H-12, J = 7.6 Hz),
7.46 (1H, d, H-9, J = 7.6 Hz), 7.40 (1H, t, H-11,
 J = 7.6 Hz), 7.22 (1H, t, H-10, J = 7.6 Hz), 5.32
(1H, q, H-19, J = 6.7 Hz), 5.04 (1H, s, H-17),
4.25 (1H, t, H-3, J = 5.2 Hz), 3.55 (2H, d, H₂-21,
 J = 1.7 Hz), 3.42 (1H, t, H-5, J = 6.5 Hz), 3.28
(1H, m, H-15), 2.75 (1H, dd, β H-6, J_1 = 11.9 Hz,
 J_2 = 4.8 Hz), 2.44 (1H, t, H-16, J = 6.5 Hz),
2.17 (3H, s, OCOCH_3), 1.93 (2H, t, H₂-14,
 J = 5.2 Hz), 1.70 (1H, d, α H-6, J = 12 Hz), 1.66
(3H, d, H₃-18, J = 7 Hz).

$[\alpha]_D^{20}$: -29° (c = 0.07%, CHCl_3) [Lit.: 0°]

Ajmalin



ANET et al. (1954), BIEMANN et al. (1964)

UV λ_{max} : 293 nm, 249 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 326(M^+ , 35), 311($M^+ - CH_3$, 14), 199(43), 182(86), 158(34), 157(32), 144(100).

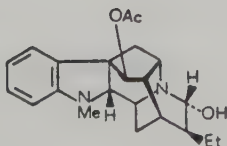
IR ν_{max} (cm^{-1}): 2940, 1600, 1460, 1040, 735.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 7.24 (1H, d, H-9, J = 7.6 Hz), 7.15 (1H, t, H-11, J = 7.6 Hz), 6.77 (1H, t, H-10, J = 7.6 Hz), 6.66 (1H, d, H-12, J = 7.6 Hz), 4.44 (1H, s, H-17), 4.25 (1H, s, H-21), 3.60 (1H, d, H-3, J = 9 Hz), 3.05 (1H, br t, H-5), 2.97 (3H, s, NCH_3), 2.66 (1H, s, H-2), 2.29 (1H, m, H-15), 0.96 (3H, t, H_3 -18, J = 6.8 Hz).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +133° (c = 0.22%, CHCl_3) [Lit.: +144°]

Derivate: 17,21-O-Diacetyljajmalin

17-O-Acetyljajmalin



BOMBARDELLI et al. (1967)

UV λ_{max} : 293 nm, 249 nm.

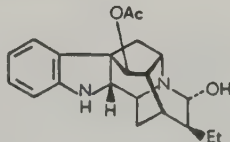
MS m/z (rel. Int. %): 368(M^+ , 9), 325(7), 194(11), 182(42),
158(60), 157(28), 144(100).

IR ν_{max} (cm^{-1}): 2940, 1740, 1600, 1460, 1230, 1040, 750.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 7.27 (1H, d, H-9, J = 7.6 Hz),
7.15 (1H, t, H-11, J = 7.6 Hz), 6.77 (1H, t, H-10,
 J = 7.6 Hz), 6.66 (1H, d, H-12, J = 7.6 Hz), 5.27
(1H, s, H-17), 4.32 (1H, s, H-21), 3.69 (1H, d,
H-3, J = 9 Hz), 3.06 (1H, br t, H-5), 2.80 (3H, s,
 NCH_3), 2.74 (1H, s, H-2), 2.46 (1H, m, H-15),
2.38 (3H, s, OCOCH_3), 0.96 (3H, t, H_3 -18, J = 6.8 Hz).

Derivate: 17,21-O-Diacetyljmalin, Ajmalin

17-O-Acetylnorajmalin

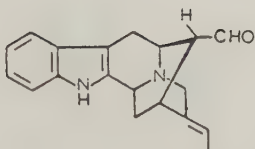


UV λ_{max} : 286 nm, 238 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 354(M^+ , 84), 293(16), 239(15), 180(31),
168(100).

Derivate: Norajmalin

Vellosimin



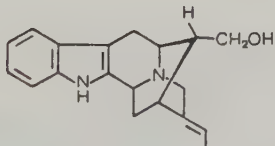
RAPOPORT und MOORE (1962), CHATTERJEE et al. (1979)

UV $\lambda_{\max}$: 288 nm, 280 nm, 272 nm, 224 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 292 (M^+ , 56), 263 ($M^+ - \text{CHO}$, 91), 249 (21), 182 (18), 169 (100).

Derivate: 10-Deoxysarpagin

10-Deoxysarpagin



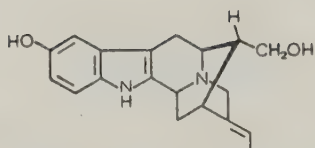
BATTERSBY und YEOWELL (1964)

UV λ_{max} : 288 nm, 280 nm, 272 nm, 224 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 294 (M^+ , 53), 263 ($M^+ - CH_2OH$, 16), 249(6), 182(11), 169(100).

Derivate: 17-O-Acetyldeoxysarpagin

Sarpagin



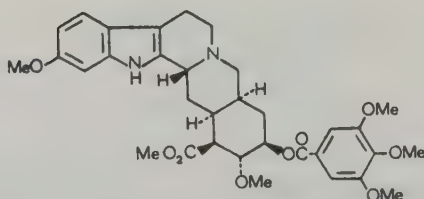
STOLL und HOFMANN (1953)

UV λ_{max} : 276 nm, 223 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 310 (M^+ , 14), 309 ($M^+ - H$, 10), 199 (10),
185 (100), 184 (98).

Derivate: Diacetylsarpagin

Reserpin

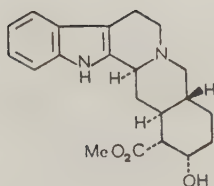


GASKELL und JOULE (1967)

UV λ_{max} : 292 nm, 267 nm, 216 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 608 (M^+ , 69), 593 (11), 577 (13), 414 (5),
397 (70), 381 (38), 366 (28), 265 (23), 251 (31),
214 (39), 195 (100).

Yohimbin

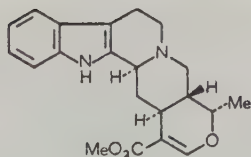


ANTONACCIO et al. (1962)

UV λ_{max} : 289 nm, 280 nm, 275 nm, 220 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 354 (M^+ , 70), 353 ($M^+ - H$, 68), 235 (16),
184 (44), 169 (100), 156 (60).

Ajmalicin

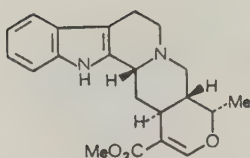


ANTONACCIO et al. (1962)

UV λ_{max} : 287 nm, 280 nm, 272 nm, 218 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 352 (M^+ , 100), 351 ($M^+ - H$, 71), 265 (21),
209 (14), 184 (35), 169 (11), 156 (50).

3-Isoajmalicin

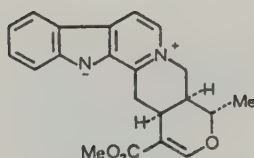


SHELLARD et al. (1968)

UV λ_{max} : 287 nm, 280 nm, 272 nm, 218 nm .

MS m/z (rel. Int. %): 352(M^+ , 100), 351(M^+-H , 55), 337(14),
265(7), 209(11), 184(32), 169(23), 156(65) .

Alstonin



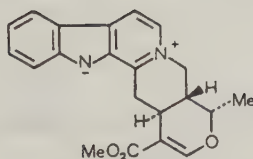
SHARP (1934), SAINSBURY und WEBB (1972)

UV λ_{max} : 365 nm, 308 nm, 220 nm .

MS m/z (rel. Int. %): 348(M^+ , 100), 292(20), 251(25), 249(18),
221(25), 207(21) .

Derivate: Tetrahydroalstonin

Serpentin



SCHLITTLER et al. (1954)

UV λ_{max} : 362 nm, 306 nm, 220 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 348(M⁺, 100), 291(22), 251(43), 249(22),
221(30), 206(40).

Derivate: Ajmalicin

Ajmalin, Yohimbin, Reserpin, Ajmalicin, Alstonin, Serpentin und Sarpagin waren spektroskopisch und chromatographisch identisch mit authentischen Referenzsubstanzen.

Wie die isolierten Strukturen zeigen, sind alle Biosynthesewege für die typischen Alkaloide aus R. serpentina in dieser Zellkultur ausgeprägt. Ein erstaunlicher Befund ist der hohe Gehalt an Indolenin-Typ Alkaloiden (Vomilenin, Vinorin), die bisher nur in kleinen Mengen aus anderen Rauwolfiaarten isoliert wurden (LIBOT et al., 1980). Bezüglich des Vomilenins wurde dieses Ergebnis später von einer sowjetischen Arbeitsgruppe bestätigt (SHIMOLINA und MININA, 1981). 17-O-Acetylnorajmalin war bisher noch nicht als natürlich vorkommendes Indolalkaloid bekannt.

2. Geissoschizin-Dehydrogenase aus R. serpentina Zellkulturen

2.1. Vergleich der Enzyme aus C. roseus und R. serpentina

Betrachtet man die Mengenverhältnisse der isolierten Alkaloidtypen, so wird deutlich, daß in dieser Suspensionskultur die Biosynthesesequenz für die Bildung von Heteroyohimbin-Typ Alkaloiden nur sehr schwach ausgeprägt ist. Zusätzlich erwies sich diese Eigenschaft als instabil und ging im Laufe weiterer Kultivierung zusammen mit der Fähigkeit zur Synthese des Reserpins verloren. Damit beschränkte sich über 99% der Alkaloidproduktion auf Strukturen des Ajmalin/Sarpagin-Typs und machte diese Gewebekultur zum geeigneten Versuchsobjekt für die Aufklärung der enzymatischen Synthese dieser Naturstoffe. Wie in III.A.3. erläutert, konnte aus Submerskulturen von C. roseus eine Geissoschizin-Dehydrogenase isoliert und charakterisiert werden. Da diese Enzympräparation noch Iminium-Cathenamin-Reduktase-Aktivität enthielt, wurde das gebildete 4,21-Dehydrogeissoschizin nach Umlagerung in die entsprechenden Iminium-Cathenaminisomere zu den drei Heteroyohimbin-Typ Alkaloiden reduziert (Abb. 14). Eine Produktcharakterisierung war unter diesen Bedingungen nicht möglich. Zellfreie Experimente zeigten nun, daß die fehlende Bildung von Ajmalicinisomeren in R. serpentina Suspensionskulturen auf eine äußerst geringe Iminium-Cathenamin-Reduktase-Aktivität zurückzuführen ist. Inkubation von Proteinrohextrakt mit Tryptamin, Secologanin und NADPH führte statt dessen zu einer Akkumulation von Geissoschizin mit einer maximalen Bildungsrate bei pH 7.5. In Abbildung 20 ist die Tryptamin-abhängige Geissoschizinbildung durch R. serpentina Rohextrakt dargestellt. Somit bot diese Kultur die Möglichkeit, in Experimenten mit relativ unreinen Proteinextrakten die Produkte der Geissoschizin-Dehydrogenase-Reaktion zu isolieren und zu charakterisieren.

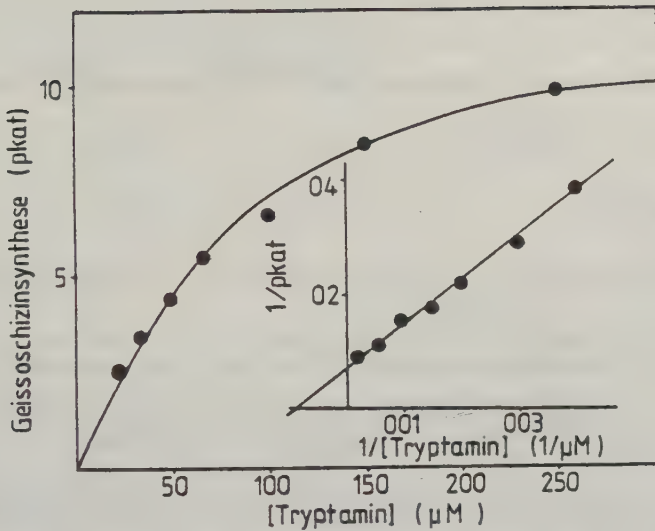


Abb. 20: Tryptaminabhängigkeit der Geissoschizininbildung durch Rohextrakt aus R. serpentina
 1 mg Protein, 2.5 mM Secologanin, 25-250 μM [$1'$ - 14 C]-Tryptamin (je 400 nCi) und 2 mM NADPH wurden in 0.5 ml 100 mM Phosphatpuffer pH 7 für 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Je 20 μl wurden in Fließmittel A aufgetrennt und die Radioaktivitätsverteilung gemessen.
 K_m : 119 μM V_{max} : 13.6 pkat

Zuerst mußte jedoch bewiesen werden, daß es sich bei den gemessenen Aktivitäten um vergleichbare Enzyme handelt, da beide Pflanzen unterschiedlichen Gattungsgruppen angehören und sich auch in ihrem Alkaloidspektrum erheblich unterscheiden. Tabelle 3 zeigt eine Gegenüberstellung der Eigenschaften beider Enzymaktivitäten aus Rohextrakten der jeweiligen Zellkulturen. Die Testbedingungen sind unter III.A.3.1. beschrieben.

Beide Enzyme scheinen sich sehr ähnlich zu sein, wobei aber die spezifische Aktivität in der Kultur von R. serpentina erheblich höher ist. Ein interessanter Aspekt ist jedoch, daß unter den gewählten Bedingungen in einem Enzymsystem aus R. serpentina die Bildung von Geissoschizin aus Tryptamin

	Geissoschizin-Dehydrogenase aus	
	<u>R. serpentina</u>	<u>C. roseus</u>
K _m -Wert Geissoschizin	90 μ M	83 μ M
pH-Optimum	7.5	7.6
Molekulargewicht	53 000 $\pm$ 10%	60 000 $\pm$ 10%
spez. Aktivität	0.4 pkat/mg	0.08 pkat/mg

Tab. 3: Vergleich der Geissoschizin-Dehydrogenasen aus Zellkulturen von R. serpentina und C. roseus

und Secologanin entschieden besser abläuft (13.6 pkat/mg Protein) als die Dehydrogenase-Reaktion (0.4 pkat/mg Protein).

2.2. Produktcharakterisierung der Geissoschizin-Dehydrogenase

Da das 4,2l-Dehydrogeissoschizin eine sehr instabile Verbindung ist und leicht zu Iminium-Cathenamin zyklisiert, wurde dieses Enzymprodukt durch chemische Derivatisierung nachgewiesen. Die Existenz einer 4,2l-Doppelbindung ließ sich durch Reduktion eines Enzymsatzes mit NaBD₄ zeigen.

Dazu wurden 0.5 mg Geissoschizin (1.4 μ Mol) mit 4 ml Rohextrakt aus R. serpentina (II.B.9.) und 10 μ Mol NADP⁺ in 5 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 für 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Dann erfolgte eine Reduktion mit einem Überschuß an NaBD₄. Durch die Hydrolyse von NaBD₄ wird der Ansatz stark alkalisch, so daß sich das Enzymprodukt zu Iminium-Cathenamin umlagert. Dieses wird dann hauptsächlich zu [2l-D]Tetrahydroalstonin reduziert (HEINSTEIN et al., 1980). Das ent-

standene Tetrahydroalstonin wurde dünnschichtchromatographisch gereinigt (III.A.1.2.) und massenspektroskopisch untersucht. Abbildung 21 zeigt ein Massenspektrum des isolierten [21-D]Tetrahydroalstonins sowie einer entsprechenden Referenz.

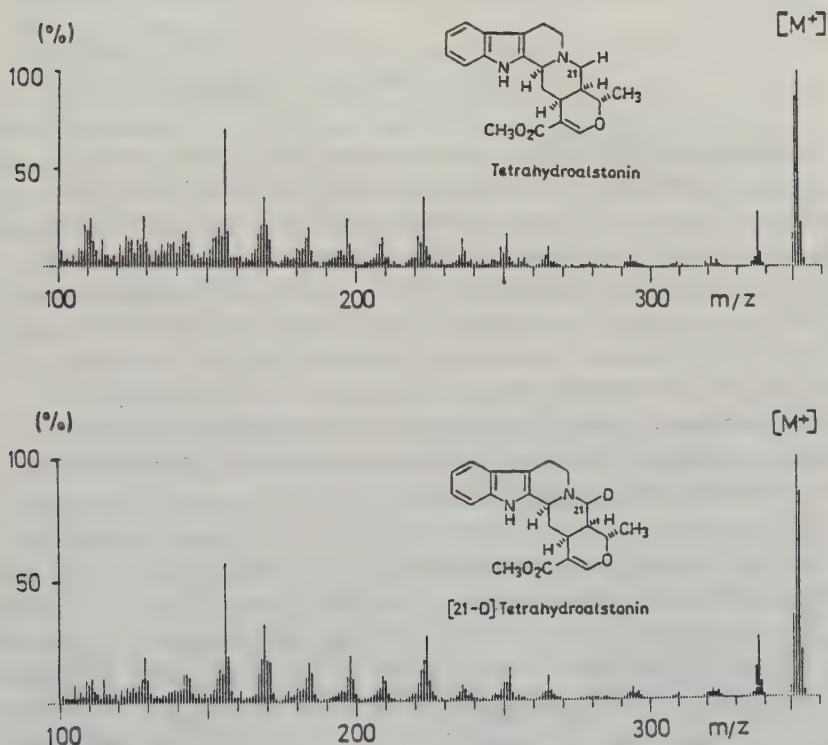


Abb. 21: Massenspektren von authentischem Tetrahydroalstonin und isoliertem Enzymprodukt nach NaBD₄-Reduktion

Aus dem Verhältnis der Massen 353/352, 338/337, 224/223 und 185/184 errechnet sich eine Einbaurrate für Deuterium von etwa 75%. Mindestens 75% des isolierten Tetrahydroalstonins sind also chemisch aus Iminium-Cathenamin entstanden.

Derselbe Ansatz wurde in Gegenwart von 25% Glycerin wiederholt und mit NaBH_4 reduziert. Es ließen sich zwei Produkte isolieren, die identische UV- und Massenspektren aufwiesen.

UV λ_{max} : 290 nm, 282 nm, 217 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 444 (M^+ , 100), 353 (17), 251 (18), 225 (20), 223 (25), 184 (69), 169 (54), 156 (62).

Nach Acetylierung (II.B.1.10.) ergibt sich folgendes Massenspektrum.

MS m/z (rel. Int. %): 528 (M^+ , 49), 353 (6), 251 (13), 225 (23), 184 (100), 169 (31), 156 (47).

Es handelt sich bei beiden Produkten um ein Glycerinaddukt (M^+ -91), an dem noch zwei acetylierbare Hydroxylfunktionen vorhanden sind. Abbildung 22 zeigt zwei mögliche Strukturtypen, wobei beide Reaktionsprodukte aufgrund der identischen Fragmentierung im Massenspektrometer sicherlich Stereoisomere darstellen. Alle Glycerinadditionsprodukte, die noch zwei freie Hydroxylgruppen besitzen, sind aber nur zu erklären, wenn man als Ausgangssubstanz ein Alkaloid mit geöffnetem E-Ring annimmt. Deshalb sprechen beide Derivatisierungsexperimente eindeutig für 4,21-Dehydrogeissoschizin als Produkt der Geissoschizin-Dehydrogenase.

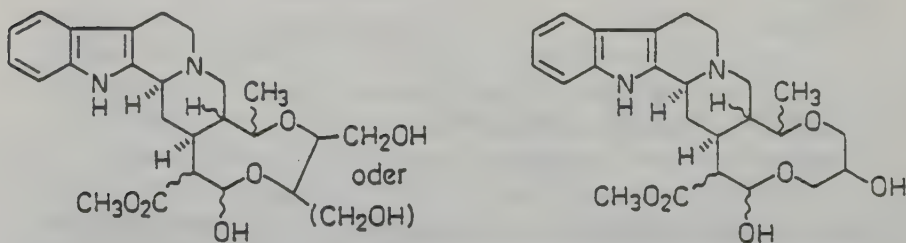


Abb. 22: Glycerinadditionsprodukte an 4,21-Dehydrogeissoschizin nach Reduktion mit NaBH_4

3. Fütterung von möglichen Vorstufen der Sarpagin/Ajmalin-Typ Alkaloide an R. serpentina Zellkulturen

Die bisher geschilderten in vitro Untersuchungen an R. serpentina machen deutlich, daß alle Enzyme für die Bildung von Geissoschizin aus Tryptamin und Secologanin in dieser Kultur vorhanden sind. Deshalb war es naheliegend zu überprüfen, ob Geissoschizin auch als Vorstufe für die Biosynthese von Ajmalin dienen kann.

Für dieses Experiment wurden je 2 ml aus der logarithmischen Wachstumsphase einer Erhaltungskultur in 25 ml LS-Medium überimpft und 7 Tage unter den in II.A.1.2. erläuterten Bedingungen weiterkultiviert. Dann wurden je 50 μ l einer methanolischen Lösung von 10.2 μ Ci [3 H-Aryl] Geissoschizin (104.3 mCi/mMol) hinzugefügt. Als Kontrolle wurden an identische Kulturen je 15 μ Ci [$1'$ - 14 C]Tryptamin (40 mCi/mMol) verfüttert. Nach 24 Stunden wurden Gewebe und Medium getrennt und die Alkaloide extrahiert (III.B.1.).

In beiden Fällen fand sich eine Aufnahmerate von 93% der applizierten Vorstufe. Der Einbau in bekannte Indolalkaloide betrug für Geissoschizin 79% und für Tryptamin 75%. Für die qualitative Auswertung dieses Versuchs wurden 10 μ Ci der 3 H-markierten und 1 μ Ci der 14 C-markierten Alkaloidmischung auf Kieselgelfolien zweidimensional aufgetrennt und die Radioaktivität mit einem Berthold-Dünnschichtscanner gemessen (Abb. 23). Es zeigte sich, daß Geissoschizin genauso wie Tryptamin als Vorstufe für alle Alkaloidtypen in R. serpentina dient.

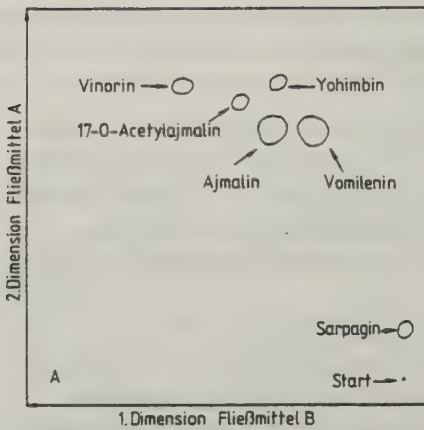
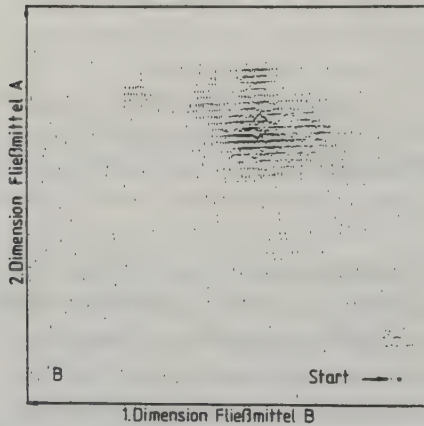


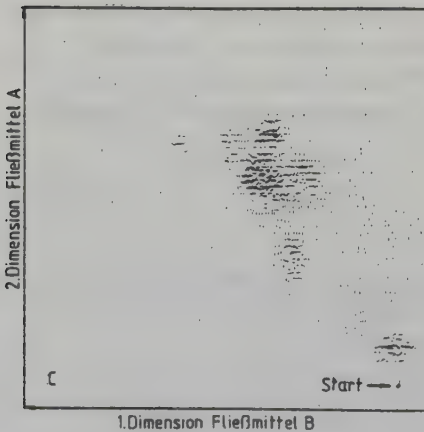
Abb. 23:

Zweidimensionale dünn-
schichtchromatographische
Auftrennung der Alkaloide
aus R. serpentina Zellkul-
turen

A: Alkaloidextrakt einer
unbehandelten Kultur



B: [^3H -Aryl] Geissoschi-
zin Fütterung



C: [^1H , ^{14}C] Tryptamin
Fütterung

4. Polyneuridinaldehyd-Esterase

4.1. Zellfreier Umsatz von Polyneuridinaldehyd

Im Gegensatz zu den hohen in vivo Einbauraten konnten mit Rohextrakt von R. serpentina keine Bedingungen gefunden werden, die zur Bildung von Ajmalin aus Geissoschizin führten. Deshalb wurde versucht, durch gezielten Einsatz putativer Intermediate einzelne Enzyme und Enzymgruppen aus der erwarteten Biosynthesesequenz zu identifizieren. Als erstes Zyklisierungsprodukt einer E-seco Vorstufe zum Sarpaginskelett schien besonders Polyneuridinaldehyd wahrscheinlich, da bei dieser Verbindung im Gegensatz zu stärker abgeleiteten Alkaloiden dieses Typs, z.B. Sarpagin, die Carboxymethylgruppe an C-16 noch vorhanden ist. Durch die Synthese nach BARTLETT et al. (1961) war dieser Aldehyd leicht zugänglich und auch die Herstellung einer [^3H -Aryl]-Verbindung bot keine Schwierigkeiten (II.B.1.5.).

Für einen ersten enzymatischen Umsatz wurden 0.25 mg Polyneuridinaldehyd (0.71 μMol) zu 4 ml Rohextrakt (28 mg Protein) in 10 ml 100 mM Phosphatpuffer pH 7 inkubiert. Nach 2 Stunden bei 30°C wurden die Alkaloide mit Essigester extrahiert und dünnschichtchromatographisch gereinigt (Fließmittelsystem A, II.B.2.1.). Es fand sich ein Produkt mit den folgenden spektroskopischen Daten.

UV λ_{max} : 289 nm, 280 nm, 220 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 292 (M^+ , 70), 291 ($\text{M}^+ - \text{H}$, 32), 263 ($\text{M}^+ - \text{CHO}$, 100), 249 (18), 182 (15), 170 (14), 169 (95), 168 (50), 115 (10).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +52° (c = 0.2%, CH_3OH)

Das Massenspektrum stimmt mit den von CHATTERJEE et al. (1979) für Vellosimin veröffentlichten Werten überein. Eine genaue Aussage über die Stereochemie insbesondere an C-16 des Moleküls ist jedoch erst nach ^1H -NMR-Analyse des Enzym-

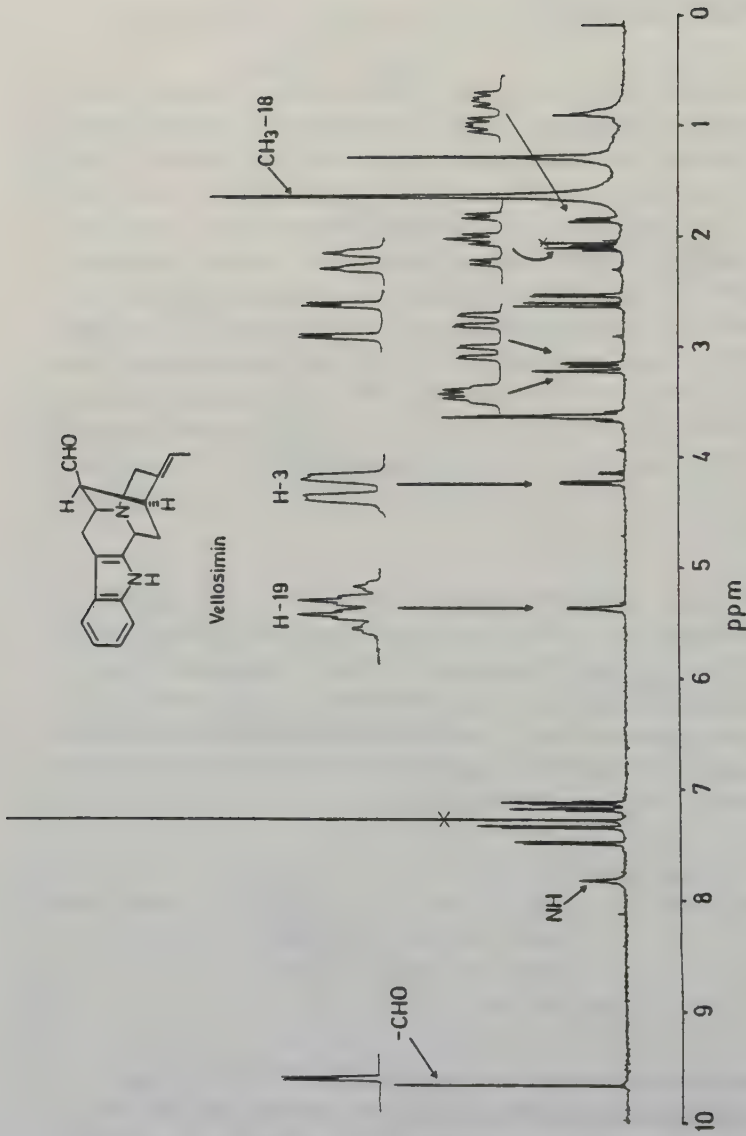


Abb. 24: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz) von Vellosimin in CDCl₃ (x = Verunreinigungen im CDCl₃)

produktes möglich. Hierzu wurden 49.5 mg Polyneuridinaldehyd (0.141 mMol) unter den oben erläuterten Bedingungen mit 20 ml Rohextrakt in 40 ml Volumen umgesetzt. Nach Reinigung auf Kieselgeldünnschichtplatten ergab sich eine Ausbeute von 10 mg (24%) des neuen Produktes. Abbildung 24 stellt das ^1H -NMR-Spektrum dieser Verbindung dar. In Anlehnung an die von SAKAI et al. (1980) publizierten Daten für 16-epi-Gardneral (11-Methoxyvellosimin) konnte diese Substanz aufgrund der chemischen Verschiebung des Aldehydprotons (9.67 ppm) als Vellosimin (RAPOPORT und MOORE, 1962) identifiziert werden.

Zur Bildung von Vellosimin aus Polyneuridinaldehyd kann man chemisch drei Schritte fordern:

1. Hydrolyse des Methylesters
2. Decarboxylierung der entstandenen Carbonsäure
3. Epimerisierung des Decarboxylierungsproduktes von einem 16(S)- zu einem 16(R)-Aldehyd

Um den Mechanismus dieser Reaktion im Detail untersuchen zu können, mußte die entsprechende Enzymaktivität von einem Großteil der Fremdproteine abgetrennt werden.

4.2. Enzymtest für die Polyneuridinaldehyd-Esterase

Als Enzymtest für diese Reinigung schien eine dünnschicht-chromatographische Auftrennung der Enzymprodukte geeignet, damit ein Auftreten von Zwischenprodukten durch Abtrennung an der Reaktion beteiligter Enzymaktivitäten direkt erfaßt werden konnte.

Folgende Standardbedingungen wurden gewählt:

3.5 nMol (3.37×10^4 dpm) [^3H -Aryl] Polyneuridinaldehyd wurden mit einem Aliquot der jeweiligen Enzympräparation in 50 μl 100 mM Phosphatpuffer pH 6.5 für 15 Minuten bei 30°C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde auf eine Kieselgelfolie aufgetragen. Nach der Entwicklung des Chromatogramms in Fließmittel A (II.B.2.1) wurde die Radioaktivitäts-

verteilung mit dem Linearscanner gemessen. Eine Quantifizierung erfolgte über die Integration der Radioaktivitätsmaxima. Als Maß für die Enzymaktivität wurde die Abnahme von Polyneuridinaldehyd herangezogen.

4.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Spaltung der Carboxymethylgruppe des Polyneuridinaldehyds setzt ein Enzym mit hydrolytischer Aktivität voraus. Esterasen zeichnen sich aber im allgemeinen durch eine geringe Substratspezifität aus (KIRSCH, 1971) und sind in pflanzlichem und tierischem Gewebe weit verbreitet. Deshalb mußte vor einem Reinigungsversuch sichergestellt werden, daß das eingesetzte Substrat nicht von unspezifischen Esterasen umgesetzt wird. Dieser Nachweis konnte durch Auftrennung der Proteine aus R. serpentina Rohextrakt mittels einer diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach DAVIS (1964) geführt werden. Diese Methode macht sich die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen im elektrischen Feld zunutze. Als Trägermaterial wird ein Polymer aus Acrylamid und Bisacrylamid verwendet, das abhängig von der gewählten Monomerenkonzentration über unterschiedlich große Poren verfügt. Dadurch erhält man eine Auftrennung der Proteine sowohl nach Ladungsdichte als auch nach Molekülgröße. Das diskontinuierliche Puffersystem (Sammelgel pH 6.3, Trenngel pH 8.9) führt zu der Ausbildung von äußerst scharfen Proteinbanden im Trenngel und macht diese elektrophoretische Methode zu einem hochauflösenden Analysensystem.

Je 0.1 ml Rohextrakt (0.3 mg Protein) wurden auf zwei Polyacrylamid-Rundgelen (0.6 x 10 cm) aufgetrennt, wobei das Trenngel eine Acrylamidkonzentration von 7.5% aufwies. Das erste Gel wurde auf unspezifische Esterase-Aktivität (II.B.8.2.) angefärbt. Das zweite Gel wurde in 2mm dicke Scheiben geschnitten und diese 14 Stunden bei 4°C mit je 0.2 ml 100 mM Phosphatpuffer pH 7 eluiert. 50 µl dieses

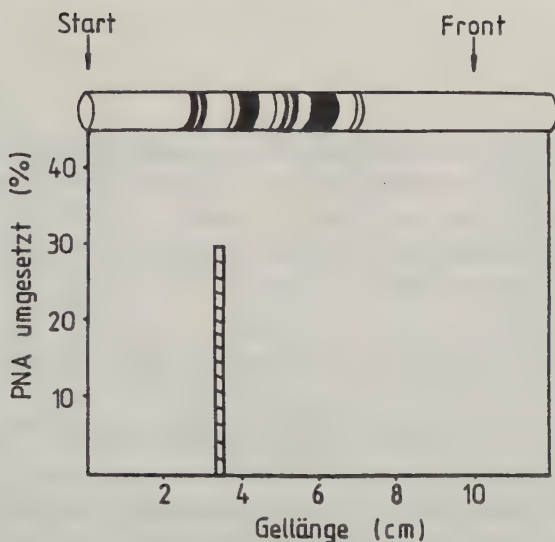


Abb. 25: Gelelektrophoretische Auftrennung der löslichen Proteine aus *R. serpentina* Zellkulturen und Analyse der enzymatischen Spaltung von β -Naphthylacetat (■) und PNA (▨)

Eluats wurden dann unter Standardbedingungen auf enzymatische Aktivität getestet. Abbildung 25 verdeutlicht, daß von den 10 aufgetrennten unspezifischen Esterasen keine in der Lage ist, Polyneuridinaldehyd zu spalten. Andererseits ist Vellosiminbildung nur mit dem Eluat eines Gelscheibchens zu beobachten. Aufgrund des hohen Auflösungsvermögens der Gelelektrophorese wurde dieser Befund als Hinweis dafür genommen, daß diese Reaktion durch ein spezifisches Enzym katalysiert wird. Es wurde Polyneuridinaldehyd-Esterase (PNA-Esterase) genannt.

4.4. Anreicherung der Polyneuridinaldehyd-Esterase

4.4.1. Gewebeaufschluß

Für die Reinigung wurde Gewebe von R. serpentina Zellkulturen in LS-Medium angezogen und nach 7 Tagen abgeerntet. Das eingefrorene Zellmaterial (500 g) wurde in 1 Liter 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 10 mM MSH aufgeschlossen und die Zelltrümmer abzentrifugiert (II.B.9.).

4.4.2. DEAE-Cellulose Ionenaustauscherchromatographie

Der Überstand (1.4 l) wurde auf eine DEAE-Cellulose Säule (2 x 23 cm) gepumpt, die mit dem Aufschlußpuffer äquilibriert war. Nach dem Auswaschen des nicht gebundenen Proteins mit 150 ml Puffer wurde mit einem linearen Gradienten von 0-0.3 M KCl in Phosphatpuffer eluiert. Bei einer Flußrate von 20 ml/h wurden 180 Fraktionen zu 3 ml aufgefangen. Die Fraktionen 91-120 (150 mM KCl) zeigten Velloosiminbildung, enthielten aber auch unspezifische Esterase-Aktivität. Sie wurden vereinigt und gegen 5 Liter 10 mM Phosphatpuffer pH 7, 10 mM MSH dialysiert.

4.4.3. Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit

Im Gegensatz zu allen bisher verwendeten Proteinreinigungsmethoden ist die Chromatographie an Hydroxylapatit eine rein empirische Methode. Obwohl deshalb das Bindungsverhalten des betrachteten Proteins nicht vorhersagbar ist, werden oft erstaunliche Trennleistungen erzielt, die mit anderen Reinigungsmethoden nicht erreicht werden konnten. Auch für die Reinigung der PNA-Esterase erwies sich diese Chromatographiemethode als sehr geeignet.

Das dialysierte DEAE-Eluat wurde auf eine HA-Sepharose Säule (1.5 x 9 cm) gegeben und mit einem linearen Kaliumphosphat-

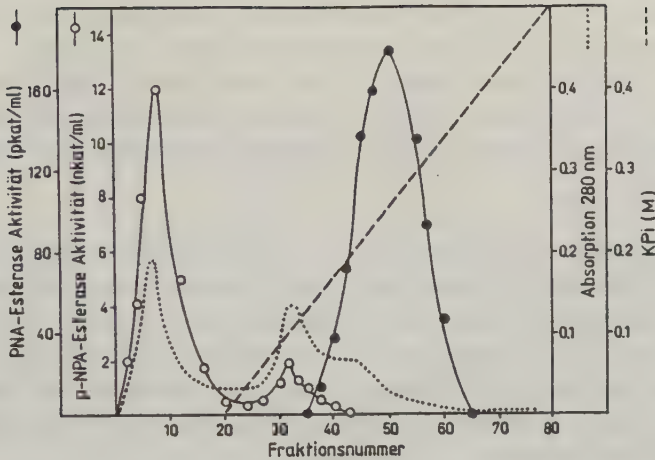


Abb. 26: Auftrennung von unspezifischen Esterasen und PNA-Esterase an Hydroxylapatit

gradienten (0-0.5 M) bei einer Flußrate von 30 ml/h eluiert. 2 ml Fraktionen wurden aufgefangen und auf PNA-Esterase-Aktivität sowie auf hydrolytische Aktivität gegen p-Nitrophenylacetat (p-NPA) getestet. Das Maximum der PNA-Esterase-Aktivität wird bei einer Phosphatkonzentration von 0.25 M eluiert (Abb. 26). p-NPA-Esterasen dagegen binden entweder gar nicht an die Matrix oder werden bei geringeren Salzkonzentrationen von der Säule gewaschen. Sie können also durch diese Chromatographie quantitativ von der PNA-Esterase abgetrennt werden.

Die Fraktionen 41-60 (37 ml) wurden vereinigt, mit einer Berghof-Zelle auf 7 ml eingengt und gegen 5 Liter Aufschlußpuffer dialysiert.

4.4.4. Gelfiltration an ACA 54

Als letzter Reinigungsschritt wurde eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße durchgeführt. Das dialysierte und eingengte Eluat der HA-Sepharose Säule wurde auf eine

Konzentration von 10% Glycerin eingestellt und auf eine ACA 54 Säule (2.3 x 92 cm) geschichtet. Dann wurde mit 20 mM Phosphatpuffer pH 7, 10 mM MSH nachgewaschen (Flußrate 20 ml/h) und 120 Fraktionen zu 3 ml aufgefangen. Die Fraktionen 65-77 wurden vereinigt und für die Charakterisierung der PNA-Esterase verwendet. Tabelle 4 faßt alle Reinigungsschritte zusammen.

Eine Lagerung der PNA-Esterase im oben genannten Puffer bei 0°C war ohne Aktivitätsverlust über 6 Monate hinweg möglich. Dagegen führte die Abwesenheit von MSH unter gleichen Bedingungen schon nach 4 Tagen zu einer 80%igen Inaktivierung. Durch Inkubation dieser Enzymlösung für 20 Stunden bei Raumtemperatur in 200 mM MSH konnte jedoch die volle Aktivität zurückgewonnen werden.

4.5. Charakterisierung der Polyneuridinaldehyd-Esterase

4.5.1. pH-Abhängigkeit des Umsatzes von Polyneuridinaldehyd

Die Aktivität der PNA-Esterase bei unterschiedlichen pH-Werten wurde mit je 5 µl gereinigtem Enzym unter Standardbedingungen bestimmt. Das Enzym ist über einen breiten pH-Bereich aktiv und zeigt ein Optimum bei pH 6.5 (Abb. 27).

4.5.2. Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht wurde durch Gelfiltration an einer geeigneten ACA 54 Säule (2.3 x 92 cm) bestimmt. Die genauen Chromatographiedaten finden sich unter II.B.3., Abbildung 12. Für die PNA-Esterase ergab sich ein Molekulargewicht von $32\,400 \pm 10\%$.

Reinigungs- schritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Aktivität (nkat)	spez. Akt. (nkat/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (x-fach)
Rohextrakt	1400	1064	295	0.26	100	1.0
vereinigte DEAE-Cellulose Fraktionen	100	115	145	1.26	49	4.8
vereinigte Hydroxylapatit Fraktionen	37	8.9	45.2	5.08	15.3	19.5
vereinigte AcA 54 Fraktionen	40	2.0	33.8	16.90	11.5	65.0

Tab. 4: Anreicherung der PNA-Esterase aus B. serpentina Suspensionskulturen

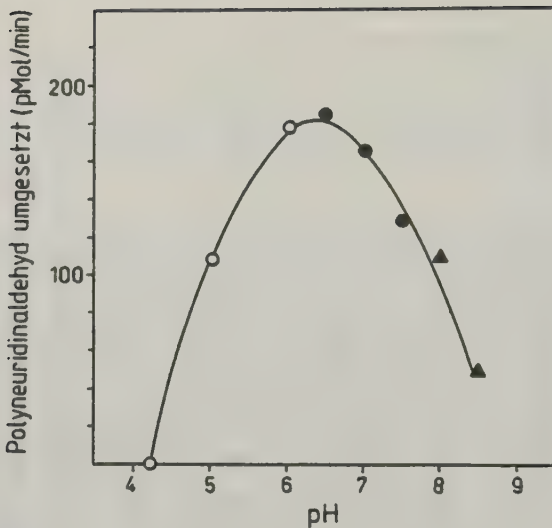


Abb. 27: pH-Abhängigkeit der PNA-Esterase-Aktivität
Der Enzymtest erfolgte unter Standardbedingungen in
0.1 M Citrat-Phosphat-Puffer (○), 0.1 M Phosphat-
Puffer (●) und 0.1 M Borat-Puffer (▲).

4.5.3. Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Genauso wie das Molekulargewicht wird der isoelektrische Punkt eines Proteins durch die Primärstruktur bestimmt. Diese Messung ist nicht nur zur Charakterisierung eines Enzyms notwendig, sondern erlaubt auch Aussagen über den Ladungszustand des Proteins bei unterschiedlichen pH-Werten. Deshalb ist die Kenntnis dieser Größe für eine Enzymreinigung von großer Wichtigkeit.

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes erfolgte durch Chromatofokussierung nach SLUYTERMAN (1978). Das Aktivitätsmaximum der PNA-Esterase wurde bei einem pH-Wert von 5 eluiert (II.B.4.).

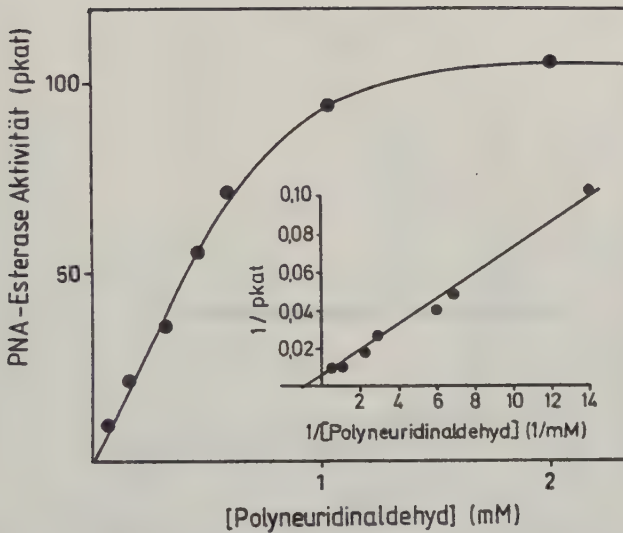


Abb. 28: Substratabhängigkeit der PNA-Esterase
 K_m : 1.25 mM V_{max} : 167 pkat

4.5.4. Einfluß der Substratkonzentration auf die Aktivität der Polyneuridinaldehyd-Esterase

Zur Bestimmung des K_m -Wertes für den Umsatz von Polyneuridinaldehyd wurde die Substratkonzentration im Bereich von 0.05-2.0 mM variiert. Das Gesamtvolumen der Ansätze betrug 0.5 ml, je 170 pkat PNA-Esterase wurden eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in 100 mM Phosphatpuffer pH 7 für 60 Minuten bei 30°C. Der Umsatz von Polyneuridinaldehyd wurde chromatographisch bestimmt (III.B.4.2.).

Wie in Abbildung 28 dargestellt ist, zeigt sich für Polyneuridinaldehyd eine normale MENTEN-Kinetik. Die MICHAELIS-MENTEN-Konstante betrug 1.25 mM bei einer maximalen Umsatzgeschwindigkeit von 167 pkat.

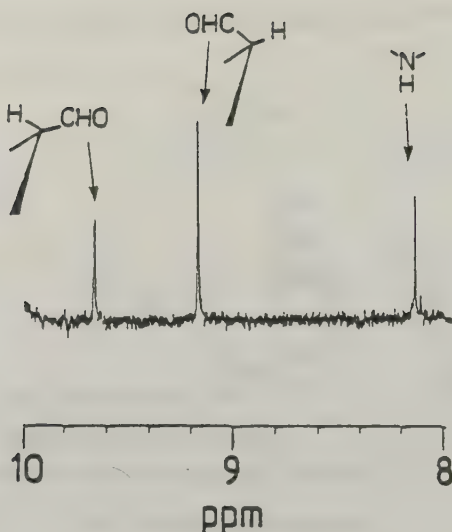


Abb. 29: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum (200 MHz, D_6 -Aceton) eines Gemisches von 16-epi-Vellosimin und Vellosimin

4.5.5. Untersuchungen zum Mechanismus der Vellosiminbildung

Die zur Reinigung der PNA-Esterase angewendeten Chromatographiemethoden führten jeweils zur Elution eines symmetrischen Aktivitätsmaximums und legten somit wie die Polyacrylamid-Gelelektrophorese nahe, daß diese Reaktion von einem Enzym katalysiert wird. Andererseits zeigte sich aber dünn-schicht-chromatographisch (Fließmittelsystem A, II.B.2.1.) noch ein zweites Produkt mit dem R_F -Wert 0.65 (PNA: R_F -Wert 0.8, Vellosimin: R_F -Wert 0.3), dessen Massenspektrum das gleiche Fragmentierungsmuster wie Vellosimin aufwies. Es mußte sich folglich um ein Stereoisomeres dieser Verbindung handeln. Zur Identifizierung dieses Enzymproduktes wurden 3.6 mg Polyneuridinaldehyd ($10.3 \mu\text{Mol}$) mit 15 ml 65fach angereicherter PNA-Esterase (12.7 nkat) 20 Minuten bei 37°C und pH 7 inkubiert. Dünn-schicht-chromatographisch zeigte sich ein quantita-

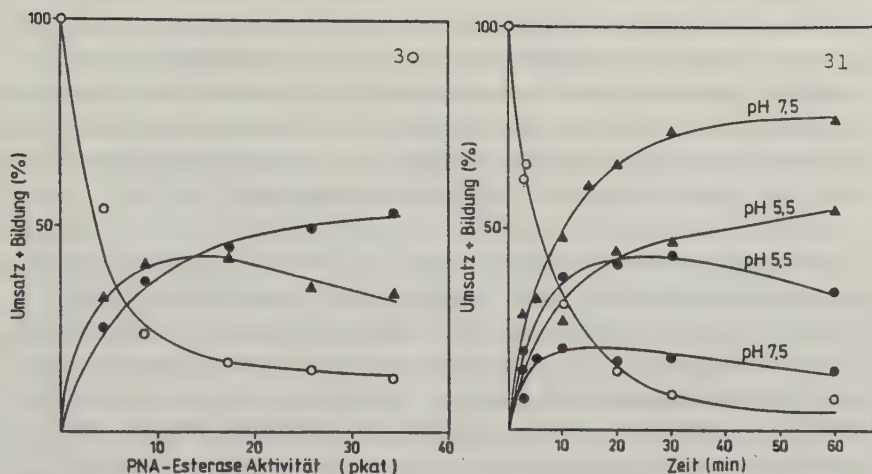


Abb. 30: Einfluß der eingesetzten PNA-Esterase-Aktivität auf das Verhältnis von Vellosoimin zu 16-epi-Vellosoimin. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen.

Abb. 31: Kinetik der Produktbildung während der PNA-Esterase-Reaktion bei unterschiedlichen pH-Werten. In 0.1 M Citrat-Phosphat-Puffer pH 5.5 oder in 0.1 M Phosphat-Puffer pH 7.5 wurden je 275 nMol PNA und 635 pkat PNA-Esterase bei 30°C in einem Volumen von 1 ml inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden je 50 µl entnommen und das Produktverhältnis bestimmt.

Polyneuridinaldehyd (○—○)
 Vellosoimin (△—△)
 16-epi-Vellosoimin (●—●)

tiver Umsatz von Polyneuridinaldehyd. Der Ansatz wurde mit Essigester extrahiert und nach dem Eindampfen der organischen Phase ein ^1H -NMR-Spektrum von diesem Alkaloidgemisch aufgenommen. In Abbildung 29 ist ein Ausschnitt dargestellt. Zusätzlich zu dem Signal für das Aldehydproton des Vellosoimins bei 9.67 ppm findet sich ein zweites bei 9.16 ppm. Nach SAKAI *et al.* (1980) kann diese Resonanz nur durch den Aldehydwasserstoff eines C-16 Epimeren des Vellosoiminmoleküls erklärt werden. Die Decarboxylierung von Polyneuridinaldehyd ist also unter Retention der Stereochemie an C-16 möglich.

Wie Abbildungen 30 und 31 verdeutlichen, hängt das Verhältnis von Vellosimin zu Epivellosimin sehr stark von der eingesetzten Enzymmenge, dem pH-Wert und der Inkubationszeit ab, wobei in Gegenwart von hohen Enzymaktivitäten und bei leicht saurem pH-Wert (pH 5.5) die Bildung von 16-epi-Vellosimin begünstigt ist. Diese Befunde ließen eine Epimerisierungsreaktion von Epivellosimin zu Vellosimin vermuten.

Zur Klärung dieses Problems wurden 130 nMol [^3H -Aryl] Polyneuridinaldehyd (4.4 mCi/mMol) mit 1.7 nkat gereinigter PNA-Esterase für 15 Minuten bei 30°C inkubiert und das gebildete 16-epi-Vellosimin dünnenschichtchromatographisch gereinigt. Je 5.2 nMol wurden bei pH 5 und pH 7.5 mit und ohne 34 pkat PNA-Esterase inkubiert und in 10-minütigem Rhythmus Proben entnommen. Eine dünnenschichtchromatographische Analyse zeigte, daß 16-epi-Vellosimin spontan und pH-abhängig zu Vellosimin epimerisiert. Die Halbwertszeit betrug 75 Minuten bei pH 5 (26 μM 16-epi-Vellosimin, 0.1 M Citrat-Phosphat-Puffer, 30°C) und 20 Minuten bei pH 7.5 (26 μM 16-epi-Vellosimin, 0.1 M Phosphat-Puffer, 30°C). Enzymatischer Umsatz von Polyneuridinaldehyd (30 μMol) in saurem pH-Bereich (0.1 M Citrat-Phosphat-Puffer pH 5) mit großem Enzymüberschuß (60 nkat) und anschließende Auftrennung der Enzymprodukte in einem sauren Fließmittelsystem (System I, II.B.2.1.) machte deutlich, daß 16-epi-Vellosimin das ausschließliche Produkt der PNA-Esterase ist. Eine enzymatische Epimerisierung von Vellosimin zu Epivellosimin konnte nicht beobachtet werden.

Da sich kein Zwischenprodukt der PNA-Esterase-Reaktion akkumulieren ließ, wurde versucht durch Einsatz von Hemmstoffen Aufschluß über den Reaktionsmechanismus zu gewinnen. Als erster Schritt für den Umsatz von Polyneuridinaldehyd war eine Spaltung der Carboxymethylgruppe denkbar. Nun sind nach WALSH (1981) im wesentlichen vier Gruppen hydrolytischer Enzyme aufgrund des Katalysetyps zu unterscheiden, wobei sich im aktiven Zentrum entweder ein Serinrest, ein Metallion (Zn^{2+}), eine essentielle Sulfhydrylgruppe oder eine Carboxylgruppe befindet.

Enzyme der letzten Gruppe haben ein ausgesprochen saures pH-Optimum (kleiner als pH 5), deshalb erschien ein solcher Mechanismus unwahrscheinlich. Eine primäre Hydroxylgruppe im aktiven Zentrum kann durch Reaktion mit PMSF oder p-NPA modifiziert und dadurch die Enzymreaktion verlangsamt werden. Eine Konzentration von 1 mM dieser Substanzen im Enzymsatz führte auch bei längerer Vorinkubation nicht zu einer Beeinflussung des Reaktionsablaufes. Auch die Beteiligung von Metallionen beim Umsatz von Polyneuridinaldehyd konnte nicht nachgewiesen werden. Komplexbildner wie o-Phenanthrolin oder EDTA wurden in Konzentrationen bis zu 20 mM getestet und zeigten keinen Effekt. Dagegen erwies sich das Enzym als äußerst empfindlich gegenüber SH-Reagenzien wie 2,2'-Dithioipyridin, DTNB und Jodacetamid. Abbildung 32 zeigt eine Inaktivierungskinetik für diese Hemmstoffe. In Gegenwart von

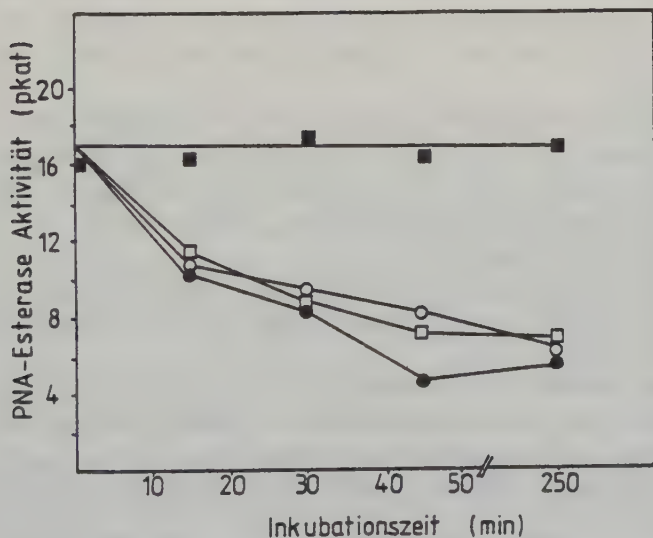


Abb. 32: Einfluß von SH-Reagenzien auf die Aktivität der PNA-Esterase
 Je 0.2 ml PNA-Esterase (170 pkat) wurden mit 0.2 ml H₂O (■), 0.2 ml 1 mM JAA (□), 0.2 ml 1 mM 2-PDS (○) oder 0.2 ml 1 mM DTNB (●) bei 30°C inkubiert. Je 40 µl der Inkubationsansätze wurden auf Aktivität getestet.

5 mM Jodacetamid fand keine Katalyse statt. Das vermeintliche Produkt der Esterase-Reaktion, eine Carbonsäure mit β -ständiger Aldehydgruppe, konnte im Inkubationsansatz nicht nachgewiesen werden. Deshalb wurde versucht, eine vermutete Decarboxylase-Aktivität dieses Enzyms zu hemmen.

Für diese Reaktion waren in Analogie zu der Cofaktor-unabhängigen Decarboxylierung von β -Ketosäuren zwei Mechanismen möglich (WALSH, 1981).

1. Die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes im aktiven Zentrum könnte mit der Aldehydfunktion eine Schiff'sche Base bilden, die dann nach Abspaltung der Carboxylgruppe hydrolysiert wird.

In Anlehnung an die klassischen Experimente von WARREN et al. (1966) zur Aufklärung der Acetoacetat-Decarboxylase-Reaktion aus Chlostridium acetobutylicum wurde versucht, dieses Imin durch NaBH_4 zu reduzieren. Im Vergleich zu Kontrollwerten ohne Substrat konnte jedoch nach der Reduktion keine Hemmung der PNA-Esterase festgestellt werden.

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis katalytisch aktiver Aminogruppen ist die Derivatisierung mit 2,4-Pentandion (GILBERT und O'LEARY, 1975). Selbst eine Endkonzentration von 40 mM dieses Hemmstoffes hatte keinen Einfluß auf die PNA-Esterase-Aktivität.

2. Ein divalentes Metallion verstärkt die Polarität des Sauerstoffatoms in der Aldehydgruppe und erleichtert so die Decarboxylierung.

Die oben beschriebenen Versuche haben jedoch schon verdeutlicht, daß die PNA-Esterase-Aktivität durch Komplexbildner nicht beeinflusst wird. Zugabe von 0.25 mM MgCl_2 , MnCl_2 oder ZnCl_2 führten sogar zu einer 50%igen Inhibition.

Nach diesen Experimenten könnte die Decarboxylierungsreaktion genauso wie die Epimerisierung spontan ablaufen, zumal β -Ketoverbindungen im allgemeinen sehr instabil sind

(WESTHEIMER und JONES, 1941). In Abbildung 33 ist der Reaktionsverlauf der Vellossiminbildung durch die PNA-Esterase zusammengefaßt.

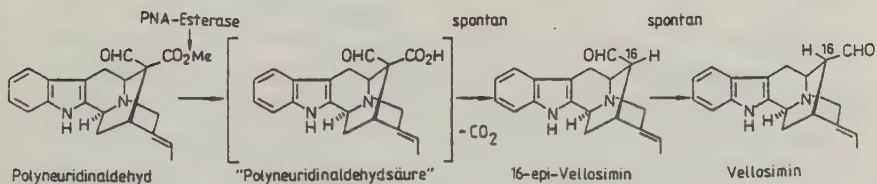
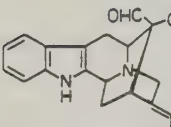
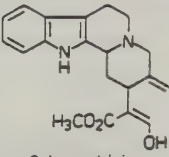
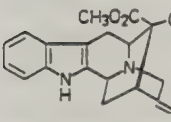
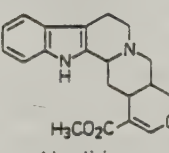
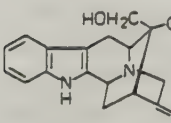
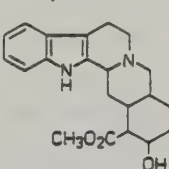
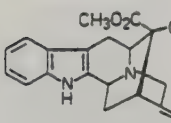
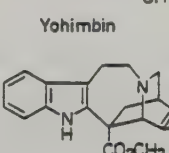
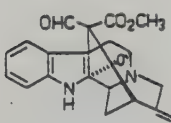
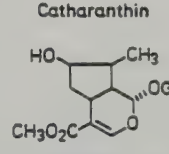
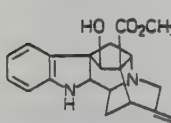
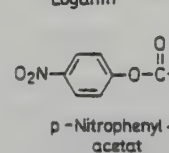


Abb. 33: Vellossiminbildung aus Polyneuridinaldehyd durch die PNA-Esterase

4.5.6. Substratspezifität der Polyneuridinaldehyd-Esterase

Um die Bedeutung eines Enzyms für einen Biosyntheseweg abschätzen zu können, ist es notwendig, die Umsatzrate von möglichst vielen unterschiedlichen Verbindungen zu bestimmen, die als Vorstufen in Betracht kommen. Zusätzlich können diese Messungen bei einer überlegten Auswahl der eingesetzten Substanzen Auskunft über den Enzymmechanismus und die Art der Substratbindung geben. Für die PNA-Esterase war die Überprüfung der Substratspezifität besonders wichtig, da die meisten der bisher beschriebenen Esterasen eine große Anzahl unterschiedlicher Verbindungen hydrolysieren. Die getesteten Strukturen sowie die maximal erzielten Umsatzraten sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Die Spaltung von Polyneuridinaldehyd und Akuammidinaldehyd wurde unter gleichen Bedingungen durch HPLC-Analyse der Enzymsätze gemessen. Die Bedingungen sind unter II.B.2.2. dargestellt. Die Bestimmung der Umsatzrate von p-Nitrophenylacetat erfolgte photometrisch (II.B.8.2.). Es wurden Enzymaktivitäten bis zu 0,5 nkat für diesen Test verwendet. Ajmalicin, Yohimbin, Catharanthin und Loganin wurden als [³H-Methyl]-Verbindungen eingesetzt (II.A.1.3.). Je 72 nMol

Substrat	Enzymaktivität %, nkat/mg	Substrat	Enzymaktivität %, nkat/mg
 Polyneuridin- aldehyd	100 (11)	 Geissoschizin	0 (0)
 Akuammidin- aldehyd	49 (5,4)	 Ajmalicin	0 (0)
 Polyneuridin	0 (0)	 Yohimbin	0 (0)
 Akuammidin	0 (0)	 Catharanthin	0 (0)
 Picralinal	0 (0)	 Loganin	0 (0)
 Quebrachidin	0 (0)	 p - Nitrophenyl - acetat	0 (0)

Tab. 5: Substratspezifität der PNA-Esterase

(8×10^4 dpm) Substrat wurden mit unterschiedlichen Mengen PNA-Esterase (bis 90 pkat) in 0.2 ml 100 mM Phosphatpuffer pH 7 bei 30°C inkubiert. Nach 0.5, 2.5, 4 und 20 Stunden erfolgte die Zugabe von 0.2 ml einer Aktivkohlesuspension (50 g/l) zur Adsorption der Alkaloide (U. PFITZNER und ZENK, 1982). Die Aktivkohle wurde abzentrifugiert und 0.2 ml des Überstandes zur Radioaktivitätsmessung abgenommen. Zur Bestimmung der maximalen Umsatzrate wurde das Substrat in 0.2 ml 5 N KOH hydrolysiert und der Überstand nach Kohleadsorption auf Radioaktivität geprüft. Polyneuridin, Akuammidin, Picralinal, Quebrachidin und [^3H -Aryl] Geissoschizin wurden unter den gleichen Bedingungen inkubiert und der gesamte Ansatz dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt (III.B.4.2.). Die Nachweisgrenze betrug bei diesen Experimenten 0.5% des Maximalumsatzes.

Bei den geschilderten Versuchen erwies sich die PNA-Esterase als überraschend spezifisches Enzym. Nur die beiden Isomere Polyneuridinaldehyd und Akuammidinaldehyd wurden hydrolytisch gespalten.

4.5.7. Taxonomische Verbreitung der Polyneuridinaldehyd-Esterase

Ein weiteres Kriterium zur Beurteilung, ob ein Enzym für die Biosynthese eines Inhaltsstoffes essentiell ist, besteht in der Korrelation von Sekundärstoffgehalt und Enzymaktivität in verschiedenen Pflanzen. Acht Pflanzenarten wurden als Zellkultur und sieben davon auch als differenzierte Pflanzen auf PNA-Esterase-Aktivität untersucht. Die Aufschlußmethoden sind unter II.B.9. und II.B.10. erläutert. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen mit bis zu 0.1 mg Protein pro Enzymansatz.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 aufgeführt. PNA-Esterase findet sich nur in R. serpentina, C. roseus und R. vomitoria. Von den getesteten Pflanzen sind diese auch die einzigen,

Art	Tribus	Familie	PNA-Esterase-Aktivität (pkat/mg Protein)	Zellkultur Pflanze
<u>Rauwolfia serpentina</u>	Rauwolfieae	Apocynaceae	330	2.9
<u>Rauwolfia vomitoria</u>	Rauwolfieae	Apocynaceae	-	2.3
<u>Catharanthus roseus</u>	Alstonieae	Apocynaceae	2.1	0.14
<u>Alstonia scholaris</u>	Alstonieae	Apocynaceae	0	0
<u>Tabernanthe iboga</u>	Tabernaemontaneae	Apocynaceae	0	0
<u>Nuclea latifolia</u>	Nucleae	Rubiaceae	0	0
<u>Nicotiana sylvestris</u>	-	Solanaceae	0	0
<u>Daucus carota</u>	-	Apiaceae	0	-

Tab. 6: Taxonomische Verbreitung der PNA-Esterase in Zellkulturen und Pflanzen (Blätter)
Nachweisgrenze: 0.045 pkat

aus denen bisher Alkaloide des Sarpagin-Typs ohne Carboxymethylgruppe isoliert wurden (KOSKINEN und LOUNASMAA, 1983).

4.5.8. Versuche zur Regulation der Polyneuridinaldehyd-Esterase

Ein wichtiger Ansatzpunkt für die Regulation einer Biosynthesesequenz ist die Hemmung von beteiligten Enzymen durch Endprodukte. Deshalb wurde untersucht, ob die PNA-Esterase durch Ajmalin oder Sarpagin beeinflusst wird.

Zu einem Standardansatz (III.B.4.2.) wurden je 0.15 mM Ajmalin oder Sarpagin gegeben und die Aktivität der Esterase bestimmt. Es ließ sich jedoch keine Hemmwirkung nachweisen. Auch eine längere Vorinkubation in Gegenwart von 1 mM Sarpagin oder Ajmalin führte nicht zu einer Inhibierung.

5. Vellosimin-Reduktase

5.1. Zellfreier Umsatz von Vellosimin

Als nächster Schritt in der Biosynthese des Sarpagins wäre entweder eine Reduktion von Vellosimin zu 10-Deoxysarpagin oder eine Hydroxylierung zu 10-Hydroxyvellosimin möglich. Da aber nur 10-Deoxysarpagin als Inhaltsstoff in dieser Zellkultur von R. serpentina nachgewiesen wurde, lag die Vermutung nahe, daß zuerst eine Reduktion der Aldehydgruppe an C-16 des Vellosimins erfolgt.

Um festzustellen, ob das an dieser Reaktion beteiligte Enzym in dieser Suspensionskultur vorhanden ist, wurden 0.2 mg Vellosimin (0.75 μ Mol) mit 10 mg NADPH (12 μ Mol) und 3 ml Rohextrakt (15 mg Protein) für 2 Stunden bei 30°C in 10 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 inkubiert. Dann wurde der

Enzymansatz mit Essigester extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (Fließmittelsystem A, II.B.2.1.). Vellosoimin wurde quantitativ zu einer Substanz mit folgenden spektroskopischen Daten umgesetzt.

UV $\lambda_{\max}$: 285 nm, 280 nm, 223 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 294 (M^+ , 53), 293 ($M^+ - H$, 30),
263 ($M^+ - CH_2OH$, 16), 249 (6), 182 (11),
169 (100), 168 (74), 115 (22).

Zur Gewinnung einer größeren Produktmenge wurde der 6fache Ansatz gewählt, jedoch in einem Volumen von 35 ml. Es konnten 8 mg Substanz isoliert werden (66% Ausbeute). Zur eindeutigen Identifizierung dieses Enzymproduktes wurde die optische Drehung bestimmt und ein 1H -NMR-Spektrum aufgenommen.

$[\alpha]_D^{20}$: +42° (c = 0.51%, CH_3OH)

1H -NMR (200 MHz, D_6 -Aceton): δ = 5.39 (1H, q, H-19, J = 7 Hz),
4.16 (1H, dd, H-3, J_1 = 10 Hz,
 J_2 = 2.5 Hz), 3.49 (1H, dd,
 CH_2OH , J_1 = 10.5 Hz, J_2 = 6 Hz),
3.42 (1H, dd, CH_2OH , J_1 = 10.5 Hz,
 J_2 = 8.5 Hz), 1.60 (3H, dt,
H₃-18, J_1 = 7 Hz, J_2 = 2 Hz).

Diese spektroskopischen Daten stimmen mit der Struktur von 10-Deoxysarpagin (BATTERSBY und YEOWELL, 1964) überein. Abbildung 34 zeigt ein Schema der nachgewiesenen Enzymreaktion.

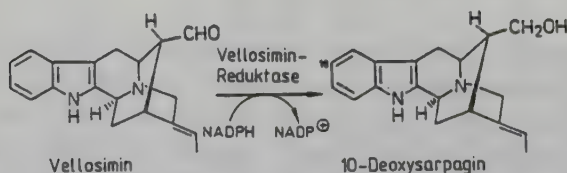


Abb. 34: Bildung von 10-Deoxysarpagin aus Vellosoimin

Es läßt sich also eine Enzymaktivität nachweisen, die in der Lage ist, die Aldehydgruppe des Vellosimins zu reduzieren.

Oxidoreduktasen und insbesondere Alkohol-Dehydrogenasen weisen oft eine geringe Substratspezifität auf (BRÄNDEN, 1975). Aus diesem Grunde mußte durch eine Überprüfung der Substratspezifität der Vellosimin-Reduktase sichergestellt werden, daß dieses Enzym essentiell für die Biosynthese von Alkaloiden des Sarpagin-Typs ist. Um diese Experimente durchführen zu können, mußte die PNA-Esterase zunächst abgetrennt werden, damit auch Verbindungen wie Polyneuridinaldehyd und Akuamminaldehyd getestet werden konnten.

5.2. Enzymtest für die Vellosimin-Reduktase

Als Maß für eine NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktase-Aktivität wird meist die Abnahme oder die Zunahme des reduzierten Co-faktors durch Messen der optischen Dichte bei 340 nm verfolgt. Diese Methode wurde von WARBURG und CHRISTIAN (1936) eingeführt und hat seitdem weite Verbreitung in der Biochemie gefunden. Für eine Bestimmung der Vellosimin-Reduktase-Aktivität wurde die Abnahme von NADPH in Gegenwart von Vellosimin gemessen.

Folgende Standardbedingungen erwiesen sich als geeignet. In einer 1 ml Quarzküvette wurden 200 nMol NADPH und 50 nMol Vellosimin in 1 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 mit maximal 30 pkat Enzym bei 30°C inkubiert und die Abnahme der Extinktion bei 340 nm mit einem PM Q2 Photometer der Firma Zeiss laufend registriert. Vellosimin und alle anderen getesteten Alkaloide wurden in 20 µl Aceton hinzugegeben. Als Nullwert diente ein Enzymansatz ohne Alkaloid, aber mit 20 µl Lösungsmittel. Die Enzymaktivität wurde aus der zeitlichen Änderung der optischen Dichte mit dem Extinktionskoeffizienten für NADPH bei 340 nm ($\epsilon_{340} = 6.317 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$) berechnet.

5.3. Anreicherung der Vellosimin-Reduktase

5.3.1. Gewebeaufschluß

500 g gefrorenes Gewebe von R. serpentina wurden mit 1 Liter 20 mM Phosphatpuffer pH 7, 10 mM MSH solange gerührt, bis das Zellmaterial aufgetaut war. Diese Suspension wurde durch 4 Lagen Mull filtriert und anschließend die Zellbruchstücke durch Zentrifugation (II.B.9.) abgetrennt. Eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung der gelösten Proteine wurde vermieden, da in Vorversuchen dieser Reinigungsschritt mit 90% Aktivitätsverlust verbunden war.

5.3.2. DEAE-Cellulose Ionenaustauscherchromatographie

Mit diesem Rohextrakt wurde eine DEAE-Cellulose Säule (2 x 23 cm) beladen und mit dem Aufschlußpuffer nachgewaschen. Dann wurde mit einem Gradienten von 0-0.3 M KCl in Phosphatpuffer eluiert. Es wurden 180 Fraktionen zu 3 ml aufgefangen und auf Vellosimin-Reduktase und PNA-Esterase getestet. Mit dieser Reinigungsmethode konnte keine Abtrennung der PNA-Esterase erreicht werden. Die Fraktionen 91-120 wurden vereinigt und gegen 5 l 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 10 mM MSH dialysiert.

5.3.3. Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit

Diese Chromatographiemethode hatte sich für die Reinigung der PNA-Esterase als äußerst nützlich erwiesen (III.B.4.4.3.). Das Elutionsverhalten der Vellosimin-Reduktase wurde daher ebenfalls an dieser Matrix studiert.

Die vereinigten Fraktionen des Ionenaustauschereluats (100 ml) wurden auf eine HA-Sepharose Säule (1.5 x 9 cm) gepumpt und mit 100 ml Dialysepuffer nachgewaschen. Während die PNA-Esterase an das Säulenmaterial bindet, war es nicht möglich,

eine Adsorption der Vellosimin-Reduktase zu erreichen. Mit diesem Durchlauf einer Hydroxylapatit Säule konnte also eine PNA-Esterase-freie Vellosimin-Reduktase-Präparation hergestellt werden. Die Waschfraktionen wurden vereinigt und mit einer Berghof-Zelle auf ein Volumen von 10 ml eingengt.

5.3.4. Gelfiltration an ACA 54

Die konzentrierte Enzymlösung wurde auf eine Glycerinkonzentration von 5% eingestellt und auf eine ACA 54 Säule (2.3 x 92 cm) gegeben. Die Elution erfolgte mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7, 10 mM MSH bei einer Flußrate von 20 ml/h. 120 Fraktionen zu 3 ml wurden aufgefangen und die Vellosimin-Reduktase und die p-NPA-Esterase gemessen. Wie Abbildung 35 zeigt, war es möglich, durch diese Gelfiltration die unspezifischen Esterasen abzutrennen, die sich bei der Ionenaustauscher- und der Adsorptionschromatographie ähnlich wie die Vellosimin-Reduktase verhalten hatten. Die Fraktionen 60-74 wurden vereinigt und gegen 5 l Aufschlußpuffer dialysiert.

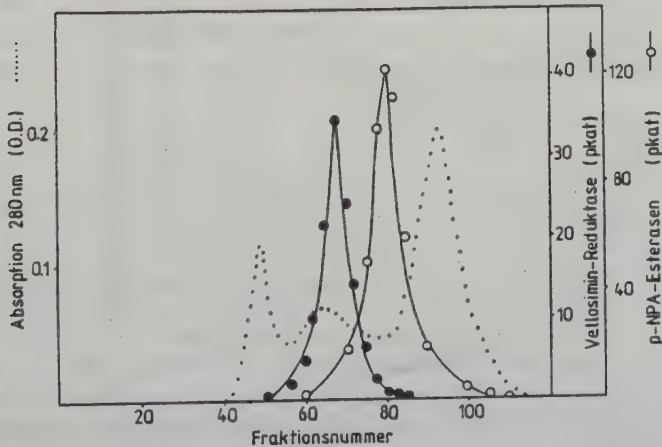


Abb. 35: Trennung von p-NPA-Esterasen und Vellosimin-Reduktase an ACA 54

5.3.5. Affinitätschromatographie an Matrex green Gel

Die effektivste Methode zur Reinigung eines Enzyms besteht in der Ausnutzung der katalytischen Aktivität dieses Proteins und besonders seiner Affinität zum Substrat. Dazu wird das Substrat an ein Trägermaterial gebunden und der Proteinrohextrakt über eine solche Säule gepumpt. Das gesuchte Enzym bindet aufgrund seiner Substratspezifität und kann dann durch einen Überschuß der entsprechenden Substanz eluiert werden. Für die Reinigung der Vellosimin-Reduktase wurde 2',5'-ADP-Sepharose getestet, ein Affinitätsgel, an das hauptsächlich NADPH-abhängige Oxidoreduktasen binden (BRODELIUS, 1974). Die Adsorption des Enzyms an diese Matrix war jedoch so stark, daß eine Elution nur durch drastische Methoden (z.B. hohe Salzkonzentrationen) erreicht werden konnte und mit großen Aktivitätsverlusten verbunden war. Deshalb wurde auf die Farbstoffgele der Firma Amicon zurückgegriffen. Hier sind an ein Agarosegrundgerüst polyaromatische Farbstoffe gebunden, die in ihrer Raumstruktur Dinucleotiden ähneln und daher mit Dehydrogenasen und Kinasen in Wechselwirkung treten können. Die besten Ergebnisse konnten mit Matrex green erzielt

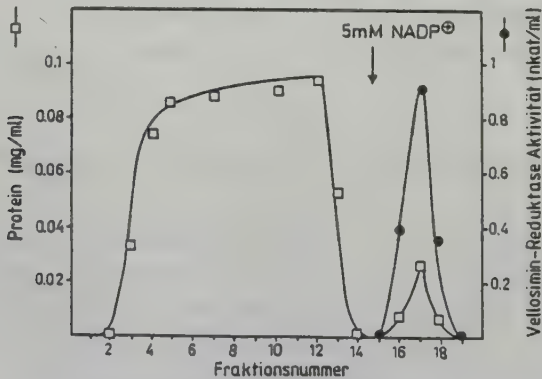


Abb. 36: Chromatographie der Vellosimin-Reduktase an Matrex green

werden.

20 ml der vereinigten Aca 54 Fraktionen (120 ml) wurden mit einer Flußrate von 4 ml/h auf eine Matrex green Säule (1 x 5 cm) gepumpt und mit 20 mM Phosphatpuffer pH 7, 10 mM MSH nachgewaschen, bis kein Protein mehr im Säulendurchlauf nachzuweisen war. Anschließend wurden 5 ml einer 5 mM NADP^{+} -Lösung auf die Säule gegeben und dort 12 Stunden belassen, damit sich ein Gleichgewicht zwischen der gebundenen und der freien Form der Vellosimin-Reduktase einstellen konnte. Das desorbierte Enzym wurde mit Waschpuffer eluiert. Die vereinigten Fraktionen mit Vellosimin-Reduktase-Aktivität wurden für die Charakterisierung des Enzyms verwendet. Abbildung 36 faßt die chromatographischen Daten zusammen. Eine kontinuierliche Elution mit einem NADP^{+} -Gradienten erwies sich als ungeeignet, da hierbei nur 1% der Ausgangsaktivität zurückgewonnen wurde.

In Tabelle 7 ist eine Übersicht der Enzymreinigung dargestellt. Die hohen Aktivitätsverluste auch bei schonenden Chromatographiemethoden (Gelfiltration) sind auf die Instabilität der Vellosimin-Reduktase zurückzuführen. Ein Rohextrakt von R. serpentina zeigte nach 24stündiger Lagerung bei 0°C eine Abnahme der Enzymaktivität von 50%. Nach 7 Tagen konnte noch eine Restaktivität von 0.24% nachgewiesen werden.

5.4. Charakterisierung der Vellosimin-Reduktase

5.4.1. pH-Abhängigkeit des Umsatzes von Vellosimin

Der Einfluß des pH-Wertes auf die enzymatische Reduktion von Vellosimin wurde unter Standardbedingungen mit 40 pkat Enzym in 0.1 M Puffer gemessen. Wie Abbildung 37 zeigt, hat die Vellosimin-Reduktase ein scharfes Optimum der Reaktionsgeschwindigkeit bei pH 7.5. Die rapide Aktivitätsabnahme im al-

Reinigungs- schritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Aktivität (nkat)	spez. Akt. (nkat/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (x-fach)
Rohextrakt	1400	1064	369	0.35	100	1.0
vereinigte DEAE-Cellulose Fraktionen	100	115	211	1.84	57	5.3
vereinigter Hydroxylapatit Durchlauf	82	71.3	173	2.43	46.9	6.9
vereinigte ACA 54 Fraktionen	120	13.2	82.3	6.23	22.3	17.8
vereinigte Matrex green Fraktionen	36	0.86	33.2	38.5	9.0	110

Tab. 7: Anreicherung der Vellosimin-Reduktase aus R. serpentina Suspensionskulturen

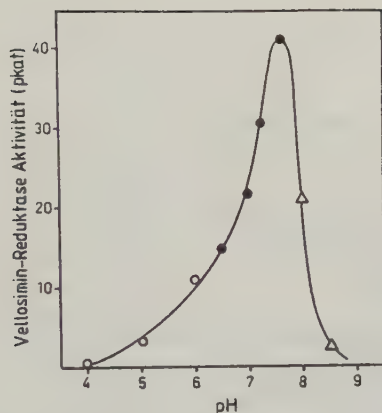


Abb. 37:

pH-Abhängigkeit der Vellosoimin-Reduktase

Der Enzymtest erfolgte in 0.1 M Citrat-Phosphat-Puffer (○), 0.1 M Phosphat-Puffer (●) und 0.1 M Borat-Puffer (△).

kalischen pH-Bereich deutet auf eine Inaktivierung des Enzyms unter diesen Bedingungen hin.

5.4.2. Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht der Vellosoimin-Reduktase wurde mit der unter II.B.3. beschriebenen Versuchsanordnung durch Gelfiltration bestimmt. Es wurde ein Molekulargewicht von $42\ 000 \pm 10\%$ ermittelt (Abb. 12).

5.4.3. Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Der isoelektrische Punkt wurde durch Chromatofokussierung bestimmt (II.B.4.). Abbildung 13 zeigt das Elutionsprofil einer solchen Säulenchromatographie. Es wurde ein isoelektrischer Punkt von pH 5 gemessen.

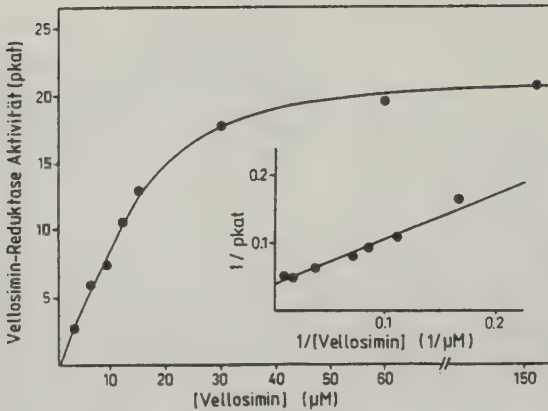


Abb. 38: Abhängigkeit der Vellosoimin-Reduktase von der eingesetzten Vellosoiminkonzentration
 K_m : 16.7 μM V_{max} : 24 pkat

5.4.4. Einfluß der Substratkonzentration auf die Aktivität der Vellosoimin-Reduktase

Um den Einfluß der Vellosoiminkonzentration auf die Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms zu messen, wurde in einem Standardansatz mit 24 pkat Vellosoimin-Reduktase die Substratmenge von 3-150 μM variiert. Abbildung 38 zeigt die graphische Auswertung dieses Experimentes sowie eine Linearisierung der Kurve nach LINEWEAVER und BURK (1934). Für Vellosoimin errechnet sich eine MICHAELIS-Konstante von 16.7 μM .

Bei einer konstanten Vellosoiminkonzentration (150 μM) wurde dann eine Konzentrationsabhängigkeit für NADPH aufgenommen. Wie auf Abbildung 39 dargestellt ist, zeigt die Vellosoimin-Reduktase für dieses Coenzym kein normales Bindungsverhalten. Die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit weist einen stark sigmoiden Verlauf auf und eine reziproke Auftragung der Meßdaten ist erst bei Substratkonzentrationen größer als 20 μM auswertbar. Dieses Verhalten ist typisch für Enzyme, die mehr

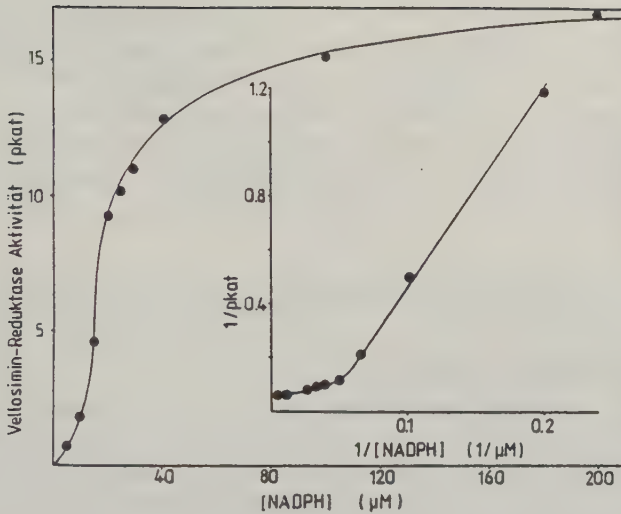


Abb. 39: Einfluß der NADPH-Konzentration auf die Aktivität der Vellosimin-Reduktase

als ein Substratmolekül pro Molekül Enzym binden können, wobei die Anlagerung eines Liganden die Bindung eines zweiten erleichtert (positive homotrope Kooperativität). Durch Auftragung der substratabhängigen Reaktionsgeschwindigkeit nach HILL oder EADIE und SCATCHARD (AHLERS, 1982) ist es möglich, die minimale Anzahl der miteinander in Wechselwirkung tretenden Bindungsstellen zu ermitteln. Da völlige Kooperativität praktisch nicht erreicht wird, ist dieser Wert immer kleiner als die Zahl der tatsächlich vorhandenen Bindungsstellen. Abbildung 40 zeigt eine Auswertung der Meßergebnisse nach EADIE und SCATCHARD. Während Enzyme mit normaler MICHAELIS-MENTEN-Kinetik bei dieser Auftragung eine Gerade ergeben, zeigt sich bei positiver Kooperativität eine Kurve, die ein Maximum durchläuft. Aus diesem Maximalwert läßt sich die Mindestzahl an Bindungsstellen mit positiver Kooperativität errechnen. Für NADPH ergibt sich ein Wert von $n = 1.95$. Ist diese Zahl ermittelt worden, so kann durch Auftragen von

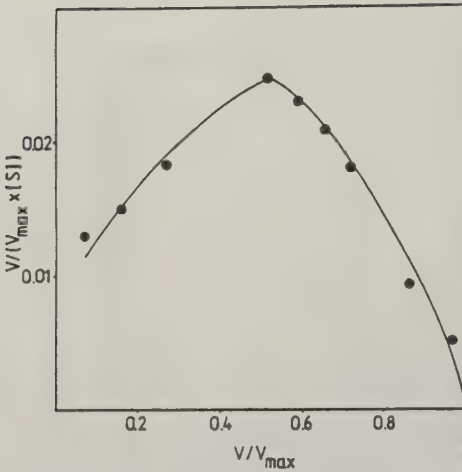


Abb. 40:

EADIE-SCATCHARD-Diagramm für den Einfluß der NADPH-Konzentration auf die Vellosoimin-Reduktase
 $n = 1.95$

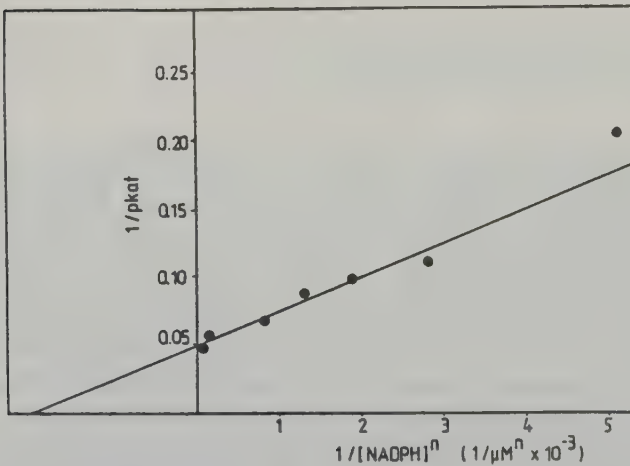


Abb. 41: Ermittlung des K_m -wertes der Vellosoimin-Reduktase für NADPH
 $K_m: 22 \mu M$ $V_{max}: 21 pkat$

$1/V$ gegen $1/S^n$ eine geradlinige Darstellung der Substratabhängigkeit erreicht werden, aus der die MICHAELIS-Konstante

zu entnehmen ist. Für NADPH wurde ein K_m -Wert von 22 μ M bestimmt bei einer maximalen Umsatzgeschwindigkeit von 21 pkat. NADH wird von der Vellosimin-Reduktase nicht als Cofaktor akzeptiert. Die Rückreaktion, eine $NADP^+$ -abhängige Oxidation von 1o-Deoxysarpagin zu Vellosimin, konnte auch bei hohem Substratüberschuß und alkalischem pH-Wert, Bedingungen, die im allgemeinen die Dehydrogenase-Reaktion begünstigen, nicht verlässlich gemessen werden.

5.4.5. Hemmstoffversuche zum Mechanismus der Vellosimin-Reduktase

Für die Alkohol-Dehydrogenase aus pflanzlichen und tierischen Organismen konnte gezeigt werden, daß Zn^{2+} für die katalytische Aktivität dieses Enzyms wichtig ist (SUND und THEORELL, 1963). Dabei wird sowohl eine strukturerhaltende Rolle als auch eine direkte Beteiligung dieses divalenten Kations an der Bindung des Substrates diskutiert. Aus diesem Grunde wurde der Einfluß von Komplexierungsagenzien auf die Aktivität der Vellosimin-Reduktase untersucht. EDTA, o-Phenanthrolin und Neocuproin wurden in einer Konzentration von 1 mM mit 11 pkat Enzym für 45 Minuten vorinkubiert und dann die

Hemmstoff	Konzentration (mM)	Aktivität (pkat)	Hemmung (%)
EDTA	1.0	2.6	76.5
o-Phenanthrolin	1.0	3.2	70.6
Neocuproin	1.0	3.9	65.0

Tab. 8: Einfluß von Komplexierungsagenzien auf die Vellosimin-Reduktase

Umsatzrate des Enzyms bestimmt. Bei allen getesteten Verbindungen zeigt sich eine deutliche Hemmung der Enzymaktivität. Eine Aktivitätssteigerung nach dem Entfernen der Hemmstoffe durch Dialyse war nicht festzustellen. Rekonstitutionsversuche mit Zn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} und Fe^{2+} sollten klären, welches Metallion für die Katalyse von Bedeutung ist. Im Konzentrationsbereich von 0.02-2 mM war jedoch keine Reaktivierung möglich.

Zusätzlich scheinen freie SH-Gruppen für die Aktivität der Vellosimin-Reduktase wesentlich zu sein. Eine Entfernung von MSH durch Dialyse aus der Enzymlösung führte zu einem völligen, irreversiblen Aktivitätsverlust.

5.4.6. Versuche zur Regulation der Vellosimin-Reduktase

Wie in den vorhergehenden Versuchen belegt werden konnte, bewirkt NADPH eine Steigerung der Vellosimin-Reduktase-Aktivität aufgrund einer positiven Kooperativität bei der Bindung des Cofaktors. Eine zusätzliche Regulationsmöglichkeit besteht in der Beeinflussung dieses Effektes durch NADP^+ .

In Gegenwart von verschiedenen NADP^+ -Konzentrationen wurde unter Standardbedingungen eine Substratabhängigkeit der Enzymreaktion für Vellosimin und für NADPH aufgenommen, um diese Hypothese zu überprüfen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 42 und 43 dargestellt. In Bezug auf beide Substrate erwies sich NADP^+ als Hemmstoff. Für Vellosimin konnte dieser Einfluß eindeutig als eine nichtkompetitive Produkthemmung identifiziert werden. Dagegen läßt der Kurvenverlauf der NADPH-Abhängigkeit auf eine kompetitive Hemmung schließen. Eine Auftragung dieser Meßdaten nach HILL ergab auch in Gegenwart von NADP^+ einen Kurvenanstieg von 1.95 (HILL-Koeffizient), allerdings bei höheren NADPH-Konzentrationen. NADP^+ übt also keinen Einfluß auf die Kooperativität der NADPH-Bindung durch die Vellosimin-Reduktase aus (Abb. 44).

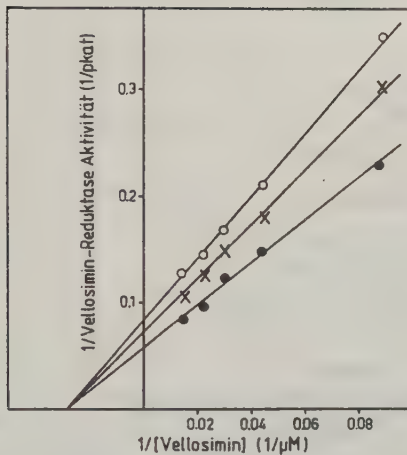


Abb.42: Vellosoimin-Abhängigkeit der Vellosoimin-Reduktase in Gegenwart von NADP^+ in der Auftragung nach LINEWEAVER und BURK
17 pkat Vellosoimin-Reduktase wurden unter Standardbedingungen in Gegenwart von 0.1 mM NADPH und 0 μM NADP^+ (●), 0.2 mM NADP^+ (×) oder 0.4 mM NADP^+ (○) getestet.

Ebenso wie für die PNA-Esterase wurde der Einfluß der Biosyntheseendprodukte auf die Vellosoimin-Reduktase überprüft. Standardaktivitätstests mit 20 pkat Enzym in Anwesenheit von 0.1-1 mM Sarpagin und Ajmalin zeigten auch nach Vorinkubation keine Änderung der Enzymaktivität.

5.4.7. Substratspezifität der Vellosoimin-Reduktase

Da 75% aller Sarpagin-Typ Alkaloide über eine freie oder derivatisierte Hydroxylgruppe an C-16 verfügen, war es interessant zu überprüfen, ob die Vellosoimin-Reduktase eine entsprechend breite Substratspezifität aufweist oder ob nur bestimmte Strukturen mit Sarpagin-Grundskelett von diesem Enzym umgesetzt werden.

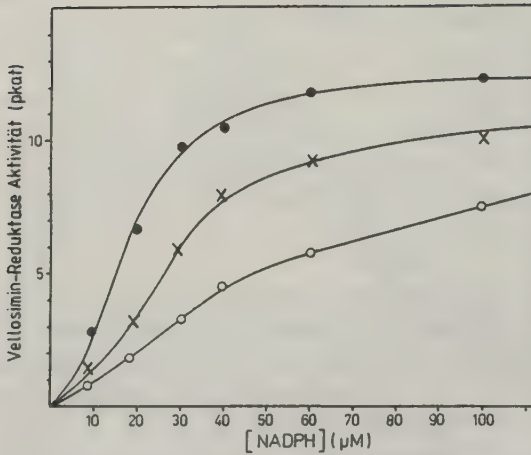


Abb. 43: NADPH-Abhängigkeit der Vellosoimin-Reduktase in Gegenwart von NADP^+ in der Auftragung nach MICHAELIS-MENTEN (1913)
17 pkat Vellosoimin-Reduktase wurden unter Standardbedingungen in Gegenwart von $45 \mu\text{M}$ Vellosoimin und 0 mM NADP^+ (●), 0.1 mM NADP^+ (×) oder 0.2 mM (○) NADP^+ getestet.

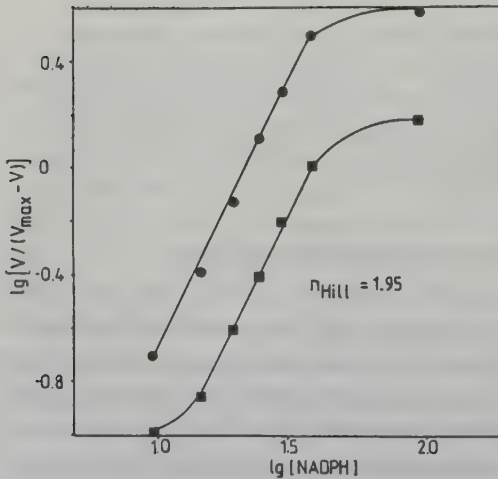
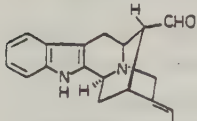
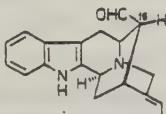
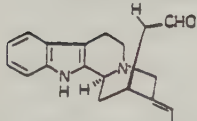
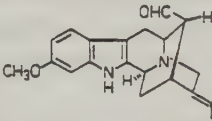
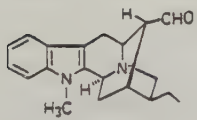
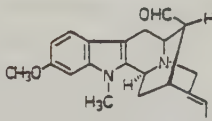
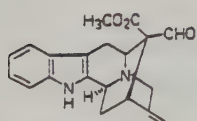
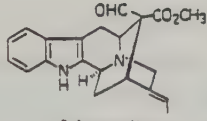
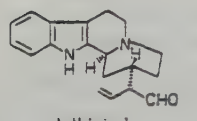
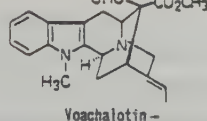
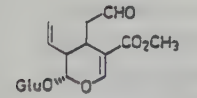
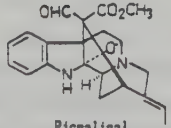


Abb. 44:
NADPH-Abhängigkeit der Vellosoimin-Reduktase in Gegenwart von NADP^+ in der Auftragung nach HILL
17 pkat Vellosoimin-Reduktase wurden unter Standardbedingungen in Gegenwart von $45 \mu\text{M}$ Vellosoimin und 0 mM NADP^+ (●) oder 0.1 mM NADP^+ (■) getestet.

Substrat	K_m (μM)	V_{max} (pkat)	Substrat	K_m (μM)	V_{max} (pkat)
 Vellosimin	17	24	 16-epi-Vellosimin	120	22.5
 Geissoschizal	110	19	 Gardneral	125	19.2
 Deoxyajmalal B	42	9.2	 N_3 -Methylgardneral	167	21.8
 Akuammidin- aldehyd	17	0.7	 Polyneuridin- aldehyd	31	0.6
 Anthirinal	15	0.5	 Voachalotin- aldehyd	133	1.2
 Secologanin	—	<0.1	 Picralinal	—	<0.1

Tab. 9: Substratspezifität der Vellosimin-Reduktase

Es wurde die Umsatzrate von 11 Alkaloiden und einem weiteren Aldehyd bestimmt. Vellosimin und 16-epi-Vellosimin wurden enzymatisch aus Polyneuridinaldehyd hergestellt, Polyneuridinaldehyd, Akuammidinaldehyd, Voachalotinaldehyd, Geissoschizal und Anthirinal nach den unter II. beschriebenen Methoden synthetisiert. Alle anderen Substrate stammten aus den erwähnten Quellen. Die Messungen erfolgten unter Standardbedingungen in einem Konzentrationsbereich von 5-200 μ M Substrat mit 24 pkat Enzym. In Tabelle 9 sind die Ergebnisse dieser Experimente aufgelistet.

Von allen eingesetzten Substraten zeigt Vellosimin eindeutig die höchste Umsatzrate, wogegen eine Reduktion von Picralinal und Secologanin nicht mehr gemessen werden konnte.

5.4.8. Taxonomische Verbreitung der Vellosimin-Reduktase

10-Deoxysarpagin und Sarpagin wurden bisher in mehr als 30 Pflanzenarten nachgewiesen, wobei die meisten aus der Gattung Rauwolfia stammen. Aber auch in Catharanthus- und Vinca-Arten kommen diese Alkaloide vor.

Um die Fähigkeit zur Biosynthese der genannten Alkaloide auch auf enzymatischer Ebene nachzuweisen, wurden Zellkulturen von 17 Pflanzenarten, davon 14 Vertreter der Apocynaceae, auf ihre Vellosimin-Reduktase-Aktivität hin überprüft. Zur Kontrolle, ob diese Ergebnisse auch auf intakte Pflanzen übertragen werden können, wurde exemplarisch Blattmaterial von C. roseus aufgeschlossen und getestet. Die Aufarbeitung des Gewebematerials erfolgte wie unter II.B.9. und II.B.10. beschrieben, die Enzymaktivität wurde photometrisch unter Standardbedingungen gemessen. Um unspezifische NADPH-Oxidation auszuschließen, wurde die Bildung von 10-Deoxysarpagin zusätzlich chromatographisch nachgewiesen. Hierzu wurden 3.5 nMol [3 H-Aryl] Polyneuridinaldehyd (3.37×10^4 dpm) mit 4.4 pkat gereinigter PNA-Esterase 1 Stunde bei 30°C in 0.1 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 10 mM MSH inkubiert.

Art	Tribus	Familie	Vellosoimin-Reduktase (μ kat/mg Protein)
<u>Rauwolfia serpentina</u>	Rauwolfieae	Apocynaceae	380
<u>Rauwolfia verticillata</u>	Rauwolfieae	Apocynaceae	320
<u>Rauwolfia vomitoria</u>	Rauwolfieae	Apocynaceae	210
<u>Alstonia scholaris</u>	Alstonieae	Apocynaceae	0
<u>Catharanthus longifolius</u>	Alstonieae	Apocynaceae	0.8
<u>Catharanthus roseus</u>	Alstonieae	Apocynaceae	260 10 ⁺
<u>Rhazya stricta</u>	Alstonieae	Apocynaceae	0.6
<u>Vinca herbacea</u>	Alstonieae	Apocynaceae	3
<u>Vinca minor</u>	Alstonieae	Apocynaceae	10
<u>Tabernanthe iboga</u>	Tabernaemontaneae	Apocynaceae	0
<u>Stemmadenia tomentosa</u>	Tabernaemontaneae	Apocynaceae	0
<u>Voacanga africana</u>	Tabernaemontaneae	Apocynaceae	0
<u>Clarissa macrocarpa</u>	Carisseae	Apocynaceae	0
<u>Picralima nitida</u>	Carisseae	Apocynaceae	0
<u>Malus sylvestris</u>	-	Rosaceae	0
<u>Coleus blumei</u>	-	Labiatae	0
<u>Nicotiana sylvestris</u>	-	Solanaceae	0

Tab. 10: Taxonomische Verbreitung der Vellosoimin-Reduktase in Zellkulturen und Pflanzen⁺
 Nachweisgrenze: 0.04 μ kat

Zu dem gebildeten [^3H -Aryl]Vellosoimin wurde dann die jeweilige Enzympräparation und 0.2 mM NADPH hinzugefügt und die Inkubation für 2 Stunden fortgesetzt. Der Enzymansatz wurde mit 0.4 ml Essigester extrahiert und dünnschichtchromatographisch analysiert (Fließmittelsystem A, II.B.2.1.). Die Enzymaktivität wurde durch quantitative Auswertung der Radioaktivitätsverteilung errechnet. Tabelle 10 zeigt die spezifische Aktivität der einzelnen Aufschlüsse.

In der Gattung Rauwolfia sind hohe Vellosoimin-Reduktase-Aktivitäten festzustellen, aber auch in den getesteten Catharanthus- und Vinca-Arten zeigt sich eine enzymatische Reduktion von Vellosoimin.

6. In vivo Untersuchungen zur Biosynthese des Sarpagins

Als letzter Reaktionsschritt in der Biosynthesesequenz zum Sarpagin wäre eine Hydroxylierung von 10-Deoxysarpagin in Analogie zur Tryptophan-Hydroxylase-Reaktion (FRIEDMAN

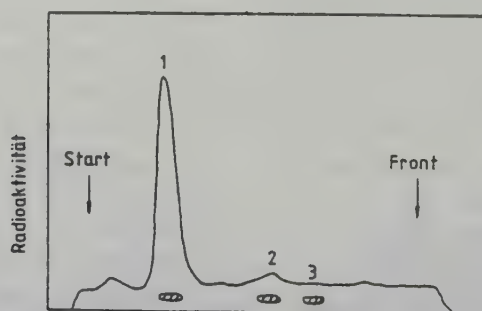


Abb. 45: Dünnschichtchromatographie eines Essigesterextraktes von R. serpentina nach Fütterung von tritiummarkiertem 10-Deoxysarpagin
1: Sarpagin
2: 10-Deoxysarpagin
3: Vellosoimin

et al., 1972) denkbar. Bisher blieben jedoch zellfreie Versuche zu dieser Enzymreaktion erfolglos. Ein Fütterungsexperiment sollte aber Aufschluß darüber geben, ob 10-Deoxysarpagin als Vorstufe für Sarpagin dienen kann.

Hierzu wurden je 37.1 μCi [^3H -Aryl] Deoxysarpagin (128.7 mCi/mMol) und je 15 μCi [$^{17}\text{-}^3\text{H}$] Deoxysarpagin (733.4 mCi/mMol) in 50 μl Methanol an R. serpentina Zellkulturen verfüttert. Die Kulturen waren vorher 7 Tage in 10 ml LS-Medium gewachsen und mit je 2 ml Gewebe angeimpft worden. Die gefütterten Vorstufen wurden entweder durch Austausch der aromatischen Protonen (II.B.1.1.) oder durch Reduktion von Vellosoimin mit NaB^3H_4 synthetisiert. Nach 1, 2 und 3 Tagen wurde das Gewebe vom Medium abgetrennt und in Gegenwart von je 5 ml 1 M Boratpuffer pH 8.5 mit 75 ml Essigester extrahiert, in dem jeweils 1 mg Sarpagin gelöst war. Die organische Phase wurde eingeeengt, auf Kieselgelplatten chromatographiert (Fließmittelsystem A, II.B.2.1.) und die Radioaktivitätsverteilung mit einem Dünnschichtscanner ausgewertet. Ein Einbau der gefütterten Vorstufe in Sarpagin konnte eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 45). Sarpagin wurde aus dem Gewebeextrakt isoliert und acetyliert. Das Acetylierungsprodukt verhielt sich chromatographisch gleich wie Diacetylsarpagin und zeigte dieselbe spezifische Radioaktivität wie das isolierte Sarpagin (3.7 mCi/mMol).

Tabelle 11 belegt, daß sich mit 10-Deoxysarpagin ungewöhnlich hohe Einbauraten (maximal 85.7%) in das hydroxylierte Biosyntheseendprodukt erzielen lassen. Inkorporation in andere Alkaloide (z.B. Vellosoimin oder Ajmalin) konnte nicht nachgewiesen werden.

gefütterte Substanz	extrahiertes Gewebe (g FG)	Fütterungs- zeit (Tage)	Radioakt. im Medium (%)	aufgenommene Radioaktivität in 10-Deoxysarpagin (%)	in Sarpagin
[³ H-Aryl]- Deoxysarpagin	8.9	1	48	9.7	67.8
[17- ³ H]- Deoxysarpagin	9	1	18	24	58.8
[17- ³ H]- Deoxysarpagin	9.95	2	10	13.5	76.5
[17- ³ H]- Deoxysarpagin	9.5	3	3.3	11	85.7

Tab 11: Fütterung von tritiummarkiertem 10-Deoxysarpagin an R. serpentina Suspensionskulturen

7. Vinorin-Synthase

7.1. Zellfreie Bildung von Vinorin

Der zentrale Reaktionsschritt zur Ausbildung des Ajmalin-Skelettes besteht in der Knüpfung der C-7, C-17 Bindung und führt zu dem für diese Alkaloidgruppe typischen hexazyklischen Ringsystem. Die ersten Versuche zu einer chemischen Synthese des Ajmalins durch BARTLETT et al. (1963) hatten gezeigt, daß ein solcher Ringschluß bei Alkaloiden des Sarpagin-Typs mit 16(S)-Konfiguration (Deoxyajmalal A) in stark saurem Milieu (5 N HCl) auftritt. Das entstehende Indolenin ist instabil und kann nur durch Reduktion oder durch Acetylierung zu einer 2-Hydroxy, 17-O-Acetyl-Verbindung abgefangen werden. Dieselbe Reaktion läßt sich auch mit Aldehyden durchführen, die an C-16 zusätzlich eine Carboxymethylgruppe besitzen und ermöglicht so die chemische Synthese von Quebrachidin und Vincamajin (N₉-Methylquebrachidin) (GOSSET-GARNIER et al., 1965). Ausgehend von diesen chemischen Modellversuchen schien das Produkt der PNA-Esterase, 16-epi-Vellosimin, eine ideale Vorstufe für eine entsprechende enzymkatalysierte Zyklisierungsreaktion zu sein.

Für einen zellfreien Umsatz wurden 1.4 μ Mol 16-epi-Vellosimin (enzymatisch aus Polyneuridinaldehyd hergestellt) zusammen mit 2 ml Rohextrakt (12 mg Protein) und 30 μ Mol Acetyl-CoA in 6 ml 100 mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 5.2 für 90 Minuten bei 30°C inkubiert. Acetyl-CoA wurde zu diesen Enzymsätzen hinzugefügt, da Vorversuche gezeigt hatten, daß Indolenin-Typ Alkaloide (Vinorin, Vomilenin) nur stabil sind, wenn die Hydroxylgruppe an C-17 verestert ist. Der Inkubationsansatz wurde mit Essigester extrahiert und die eingeengte organische Phase in dem Fließmittelsystem D (II.B.2.1.) dünnsschicht-chromatographisch aufgetrennt.

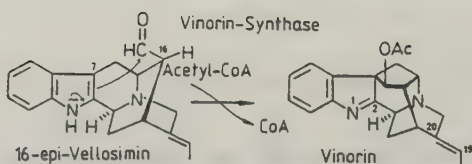


Abb. 46: Zellfreie Bildung von Vinorin aus 16-epi-Vellosimin

Neben dem Epimerisierungsprodukt Vellosimin wurde ein zweites Alkaloid isoliert. Eine massenspektroskopische Analyse ergab folgende Bruchstücke.

MS m/z (rel. Int. %): 334 (M^+ , 32), 291 (51), 275 (30), 182 (32), 169 (72), 168 (100), 154 (20).

Dieses Fragmentierungsmuster ist identisch mit dem des aus R. serpentina Zellkulturen isolierten Vinorins (STÖCKIGT et al., 1981). Die an dieser Reaktion beteiligte Enzymaktivität wurde Vinorin-Synthase genannt. Abbildung 46 zeigt ein Formelschema der nachgewiesenen Enzymreaktion.

7.2. Produktcharakterisierung der Vinorin-Synthase

7.2.1. Aufbau eines Enzymtests für eine Acetylajmalan-Esterase-Aktivität

Für eine genaue spektroskopische Analyse des Enzymproduktes war es notwendig, ca. 1-2 mg dieser Substanz herzustellen. Enzymansätze mit größeren Enzym- und Substratmengen oder bei alkalischeren pH-Werten führten jedoch nur zu einer Verringerung der Vinorinsynthese. Dieses Ergebnis war nicht auf eine Epimerisierung von 16-epi-Vellosimin zurückzuführen, sondern auf eine weitere Enzymaktivität, die das gebildete Vinorin durch Abspaltung der 17-O-Acetylgruppe abbaute. Inkubationsansätze von Vinorin, 17-O-Acetylajmalin und Acetyltetraphyl-

licin mit Rohextrakt in 100 mM Phosphatpuffer pH 7 zeigten einen quantitativen Umsatz zu den entsprechenden entacetylierten Verbindungen, wobei das Vinorin sich sofort zu Vello-simin umlagert. Zur chromatographischen Abtrennung dieser Störaktivität war die Entwicklung eines Enzymtestes notwendig. Die naheliegende Vermutung, es handele sich bei dieser Enzymaktivität um p-Nitrophenylacetat spaltende Esterasen, erwies sich als falsch. Mit den bei der Reinigung der PNA-Esterase und der Vello-simin-Reduktase angefallenen Fraktionen mit p-NPA-Esterase-Aktivität konnten die erwähnten Substrate nicht umgesetzt werden. Deshalb wurde 17-O-Acetyltetraphyllicin als Testsubstrat für eine Acetyljmalan-Esterase-Aktivität ausgewählt. Zur genauen Quantifizierung der Umsatzraten wurde [^3H -Acetyl]Acetyltetraphyllicin synthetisiert (II.B.1.4.).

Folgende Inkubationsbedingungen erwiesen sich für diesen Enzymtest als optimal.

5.4 nMol [^3H -Acetyl]Acetyltetraphyllicin (17 mCi/mMol) wurden in einem Gesamtvolumen von 0.5 ml in 100 mM Phosphatpuffer pH 7 mit der jeweiligen Enzympräparation bei 30°C inkubiert. Nach 30 Minuten wurden 0.2 ml einer Aktivkohlesuspension (50 g/l) hinzugefügt und die adsorbierten Alkaloide mit der Aktivkohle abzentrifugiert. Die durch enzymatische Hydrolyse gebildete [^3H]Essigsäure wird nicht an die Kohle gebunden, sondern verbleibt in Lösung. 0.5 ml des Überstandes wurden abgenommen und die Radioaktivität gemessen. Die Enzymreaktion zeigte eine lineare Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge und ein pH-Optimum bei pH 7.

7.2.2. Aufbau eines Enzymtestes für die Vinorin-Synthese

Auch für die Bildung von Vinorin mußte ein schneller und empfindlicher Test ausgearbeitet werden. Dies wurde durch den Einsatz von [^3H -Acetyl]Acetyl-CoA erreicht. Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze mit Essigester ausgeschüttelt und das gebildete [^3H -Acetyl]Vinorin in der organischen Phase be-

stimmt, während [^3H -Acetyl]Acetyl-CoA in der wässrigen Phase verblieb. Da das Substrat 16-epi-Vellosimin wegen seiner Instabilität nicht als Testlösung aufbewahrt werden konnte, wurde es während des Enzymtestes enzymatisch aus Polyneuridinaldehyd synthetisiert.

Folgende Standardtestbedingungen wurden verwendet. 10 nMol Polyneuridinaldehyd, 40 pkat PNA-Esterase (65fach angereichert), 10 nMol [^3H -Acetyl]Acetyl-CoA (25 nCi) und die zu testende Enzymfraktion wurden in 0.2 ml 100 mM Boratpuffer pH 8.5 für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Dann wurden die Ansätze mit 0.4 ml Essigester für 30 Minuten extrahiert und 0.3 ml der organischen Phase in einem Szintillationszähler gemessen.

7.2.3. Auftrennung von Acetyljmalan-Esterase und Vinorin-Synthase und Produktisolierung

150 g eingefrorenes Gewebe von R. serpentina Suspensionskulturen wurden aufgeschlossen (II.B.9.) und der Rohextrakt nach einer Ammoniumsulfatfällung (0-70%) gegen 5 l 100 mM Phosphatpuffer, 10 mM MSH dialysiert. 10 ml dieser Proteinlösung (5 mg Protein/ml) wurden auf eine Glycerinkonzentration von 5% eingestellt und auf eine Aca 54 Säule (2.3 x 92 cm) aufgetragen. Eluiert wurde mit dem oben genannten Puffer bei einer Flußrate von 20 ml/h. 180 Fraktionen zu 3 ml wurden aufgefangen und auf Enzymaktivität getestet.

Wie Abbildung 47 zeigt, konnte mit dieser Chromatographie zwar keine vollständige Trennung von Acetyljmalan-Esterase- und Vinorin-Synthase-Aktivität erreicht werden, aber die Fraktionen 66-74 waren frei von nachweisbarer Esterase-Aktivität und wurden für die Produktsynthese vereinigt.

20 ml der vereinigten Gelfiltrationsfraktionen wurden mit 5 mg Polyneuridinaldehyd, 12 mg Acetyl-CoA und 10 nkat PNA-Esterase in einem Volumen von 50 ml 100 mM Phosphatpuffer pH 7.5 für 60 Minuten bei 30°C inkubiert. Der Ansatz wurde

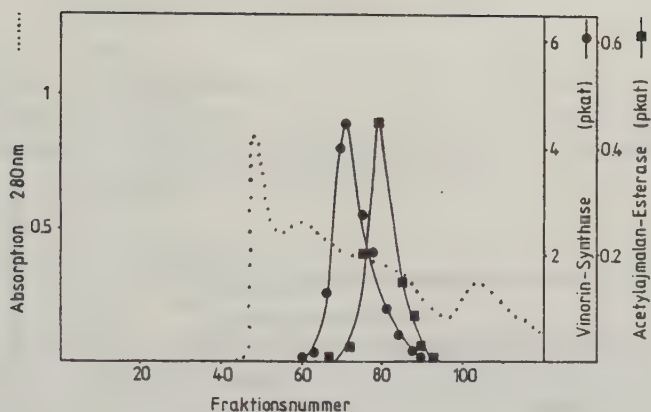


Abb. 47: Auftrennung von Vinorin-Synthase und Acetylajmalan-Esterase(n) an ACA 54

mit Essigester extrahiert und die eingeeengte organische Phase dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt (Fließmittelsystem D, II.B.2.1.). Auf diese Art konnten 1.5 mg reines Vinorin (31.4% Ausbeute) gewonnen werden. Als Referenz wurden zusätzlich 2.3 μ Mol Vinorin durch Bleitetraacetatoxidation von Acetyl-tetraphyllicin chemisch synthetisiert (II.B.1.6.). Das Enzymprodukt und die synthetisierte Substanz wurden spektroskopisch mit dem aus R. serpentina Zellkulturen isolierten Vinorin verglichen. Alle drei Vinorin-Präparationen ergaben identische UV-, MS- und ^1H -NMR-Spektren. Auch die Messung der optischen Drehung lieferte übereinstimmende Werte.

Vinorin, isoliert:

$$[\alpha]_D^{20} = 29 \pm 3^\circ \quad (c = 0.07\%, \text{CHCl}_3)$$

Vinorin, synthetisch:

$$[\alpha]_D^{20} = 30 \pm 3^\circ \quad (c = 0.05\%, \text{CHCl}_3)$$

Vinorin, enzymatisch:

$$[\alpha]_D^{20} = 30 \pm 3^\circ \quad (c = 0.11\%, \text{CHCl}_3)$$

Vinorin, MEISEL et al. (1971):

$$[\alpha]_D^{20} = 0$$

Abbildung 48 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum von Vinorin.

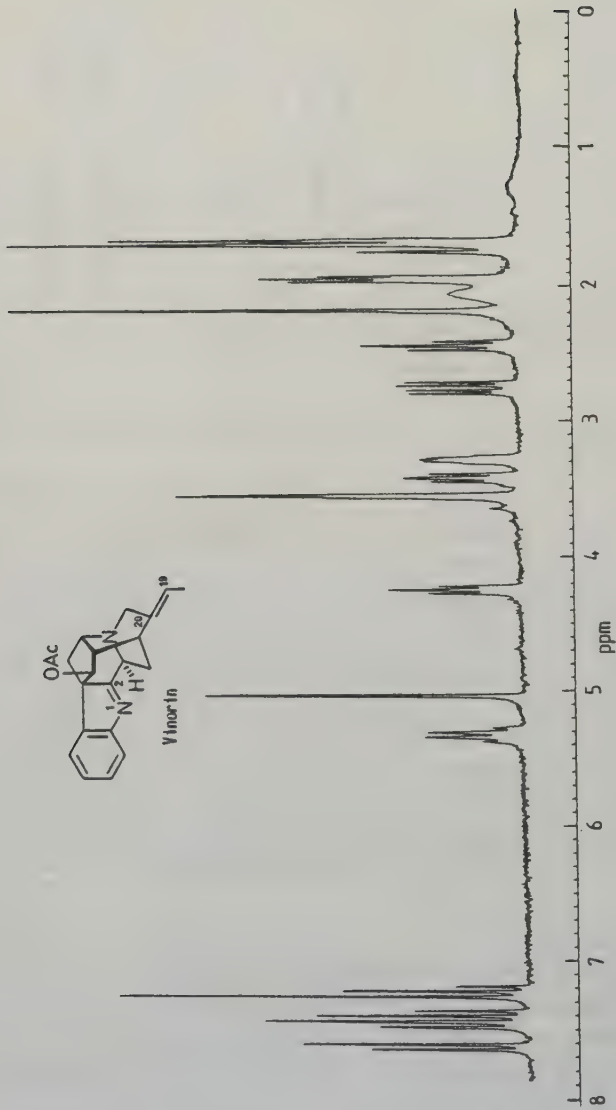


Abb. 48: ^1H -NMR-Spektrum (200 MHz) von Vinorin in CDCl_3 (Zuordnung siehe Seite 46)

7.3. Anreicherung der Vinorin-Synthase

Für eine Charakterisierung der Zyklisierungsreaktion, die zum Ajmalinskelett führt, mußten aus der Vinorin-Synthase-Präparation alle störenden Enzymaktivitäten, insbesondere die Acetyljmalan-Esterasen, entfernt werden.

7.3.1. Gewebeaufschluß

400 g eingefrorenes Gewebe von R. serpentina Suspensionskulturen wurden aufgeschlossen (II.B.9.) und der resuspendierte Proteinniederschlag nach einer Fällung mit Ammoniumsulfat (0-70%) für 12 Stunden gegen 20 mM Boratpuffer pH 8, 10 mM MSH dialysiert.

7.3.2. DEAE-Cellulose Ionenaustauscherchromatographie

Nachdem ungelöste Proteine durch 10-minütige Zentrifugation bei 48 000 x g entfernt worden waren, wurde der Überstand auf eine DEAE DE 52 Säule (2 x 25 cm) gegeben, die mit dem oben erwähnten Boratpuffer äquilibriert war. Es wurde mit 67 ml Probenpuffer nachgewaschen und dann mit einem linearen Gradienten von 0-0.5 M KCl eluiert. Bei einer Flußrate von 50 ml/h wurden 180 Fraktionen zu 4.4 ml aufgefangen und auf Vinorin-Synthase- und Acetyljmalan-Esterase-Aktivität getestet. Schon durch diesen Reinigungsschritt konnte eine Trennung beider Enzymaktivitäten erreicht werden (Abb. 49). Die Fraktionen 103-120 wurden vereinigt und durch Ultrafiltration auf ein Volumen von 12 ml eingengt.

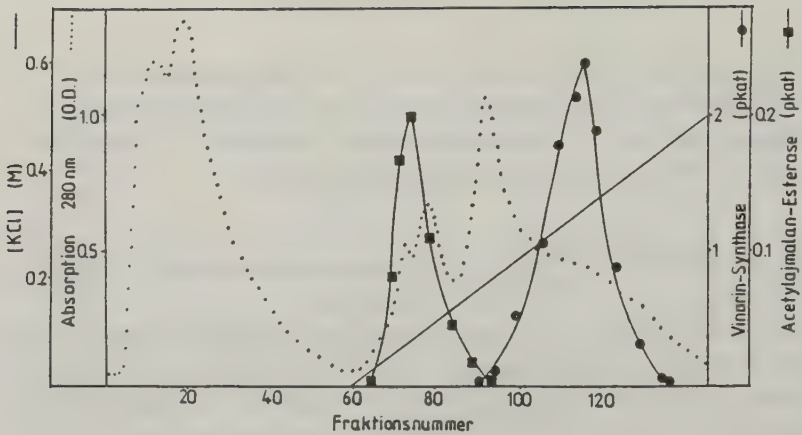


Abb. 49: Auftrennung von Vinorin-Synthase und Acetyljaldolan-Esterase(n) an DEAE DE 52

7.3.3. Gelfiltration an ACA 54

Nach Zugabe von 0.5 ml Glycerin wurde das konzentrierte DEAE-Eluat auf eine ACA 54 Säule (2.3 x 92 cm) geschichtet und mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7, 10 mM MSH eluiert. Von den aufgefängenen Fraktionen zeigten Nr. 72-85 Vinorin-Bildung und wurden vereinigt.

7.3.4. Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit

Ein weiterer Störfaktor bei der Charakterisierung der Vinorin-Synthase stellt der hohe Gehalt an PNA-Esterase in R. serpentina Zellkulturen dar, da in Gegenwart dieses Enzyms die Zyklierung von Sarpagin-Typ Alkaloiden mit einer 16-Carboxymethylgruppe nicht gemessen werden kann. Vorversuche mit Rohextrakten hatten jedoch gezeigt, daß im Gegensatz zur PNA-Esterase die Vinorin-Synthase nicht an Hydroxylapatit bindet. Diese Eigenschaft wurde zur Trennung beider Enzymaktivitäten ausgenutzt.

Die vereinigten Gelfiltrationsfraktionen wurden durch eine HA-Sepharose Säule (1.5 x 9 cm) gepumpt und mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7, 10 mM MSH nachgewaschen. Der Durchlauf wurde fraktioniert aufgefangen (40 Fraktionen zu 3 ml) und die Fraktionen auf Vinorin-Synthase-Aktivität getestet. Fraktionen 6-26 enthielten die Vinorin-Synthase, Polyneuridinaldehydspaltung war nicht nachzuweisen.

7.3.5. Hydrophobe Chromatographie an Phenyl-Sepharose

Als letzter Reinigungsschritt bei der Anreicherung der Vinorin-Synthase erwies sich eine Chromatographie an Phenyl-Sepharose als geeignet.

Jedes Protein zeichnet sich in seiner Tertiärstruktur durch hydrophobe Bereiche aus, die im wesentlichen durch die aromatischen Reste der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin gebildet werden. Genauso wie Ladungsdichte oder Molekülgröße können sie zur Reinigung von Enzymen genutzt werden. Als stationäre Phase bei dieser Säulenchromatographie finden Dextranpolymere Verwendung, an die Phenyl-, Hexyl- oder Octylgruppen kovalent gebunden sind. Um die hydrophoben Bindungskräfte zu verstärken, wird die Proteinlösung mit einer hohen Salzkonzentration versetzt (z.B. 0.5 M KCl), bevor man sie auf die Säule gibt. Die Elution erfolgt mit einem abnehmenden Salzgradienten, wobei meist steigende Mengen eines organischen Lösungsvermittlers (z.B. Äthylenglykol oder Dimethylsulfoxid) hinzugefügt werden, um schärfere Elutionsbanden zu erhalten.

Der vereinigte Hydroxylapatitdurchlauf wurde durch Zugabe von festem KCl auf eine Endkonzentration von 0.5 M eingestellt und mit einer Flußrate von 50 ml/h auf eine Phenyl-Sepharose Säule (1 x 11 cm) gepumpt, die mit der gleichen Salzkonzentration äquilibriert war. Bei derselben Pumpgeschwindigkeit wurde mit einem absteigenden Salzgradienten (0.5-0 M KCl) eluiert und gleichzeitig die Äthylenglykolkonzentration

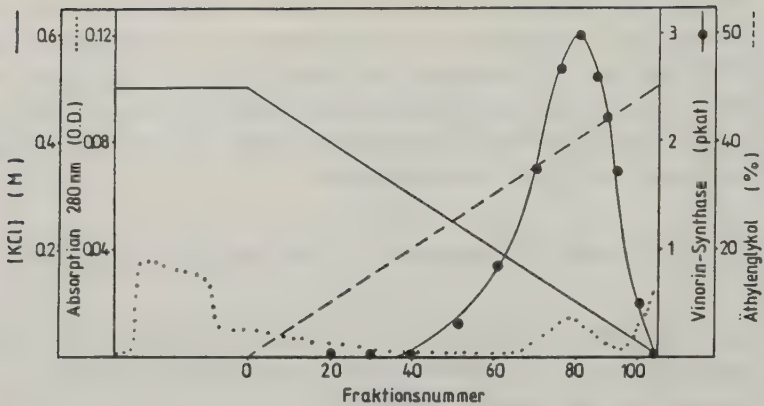


Abb. 50: Chromatographie der Vinorin-Synthase an Phenyl-Sepharose

im Puffer von 0-50% linear erhöht. Es wurden 100 Fraktionen zu je 2 ml aufgefangen. In Abbildung 50 ist das Elutionsprofil dieser Chromatographie dargestellt. Die Fraktionen 70-90 wurden vereinigt und für alle weiteren Experimente verwendet.

Diese Enzympräparation erwies sich als stabil und konnte ohne Aktivitätsverlust für drei Monate bei 0°C gelagert werden. Geringe Abnahmen der Enzymaktivität nach längerem Aufbewahren ließen sich durch erneutes Hinzusetzen von MSH wieder rückgängig machen.

Insgesamt konnte durch die Anwendung dieser 4 Chromatographieschritte eine 16fache Anreicherung der Vinorin-Synthase erreicht werden bei einer Aktivitätsausbeute von 74% bezogen auf eine durch Ammoniumsulfatfällung konzentrierte Proteinfraction. Eine Aussage über den Enzymgehalt im Rohextrakt ist nicht möglich, da hier aufgrund der hohen Acetylcholinesterase-Aktivität keine Vinorinbildung unter Standardbedingungen nachzuweisen war. Die Ergebnisse dieser Enzymreinigung sind in Tabelle 12 zusammengefaßt.

Reinigungs- schritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	Aktivität (nkat)	spez. Akt. (nkat/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (x-fach)
Rohextrakt	1160	1740	-	-	-	-
Ammoniumsulfat- fällung	57	410.4	6.35	0.015	100	1.0
vereinigte DEAE-Cellulose Fraktionen	76	36.5	8.32	0.23	131	15.3
vereinigte ACA 54 Fraktionen	52	11.5	7.9	0.69	124	46
vereinigter Hydroxylapatit Durchlauf	80	8	6.62	0.83	104	55.3
vereinigte Phenyl-Sepharose Fraktionen	76	2	4.73	2.4	74	160

Tab. 12: Anreicherung der Vinorin-Synthase aus R. serpentina Suspensionskulturen

7.4. Charakterisierung der Vinorin-Synthase

7.4.1. pH-Abhängigkeit der Vinorinbildung

Die pH-Abhängigkeit der Vinorin-Synthase-Reaktion wurde mit 0.9 pkat Enzym unter Standardbedingungen im pH-Bereich von pH 4-11 gemessen. Dabei wurde durch Kontrollansätze mit Gardneral (11-Methoxy, 16-*epi*-Vellosimin) als Substrat die Limitierung der *in situ* Bildung von 16-*epi*-Vellosimin durch die PNA-Esterase-Aktivität ausgeschlossen. Es zeigte sich ein deutliches Maximum der Vinorinbildung bei pH 8.5 (Abb. 51).

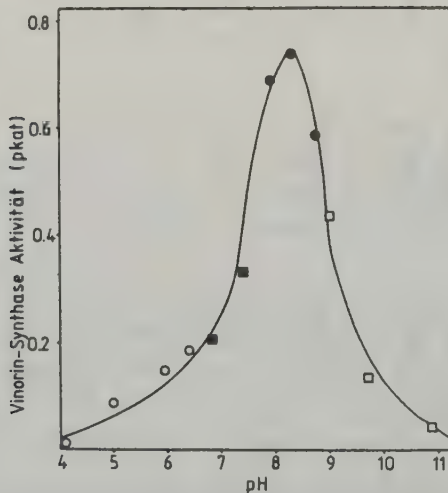


Abb. 51: pH-Abhängigkeit der Vinorin-Synthase
Der Enzymtest erfolgte unter Standardbedingungen in 0.1 M Citrat-Phosphat-Puffer (○), 0.1 M Phosphat-Puffer (■), 0.1 M Borat-Puffer (●) und 0.1 M Glycin-NaOH-Puffer (□).

7.4.2. Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekülgröße der Vinorin-Synthase wurde durch Gelfiltration an ACA 54 mit der unter II.B.3. geschilderten Versuchsanordnung bestimmt. Es ergab sich ein Molekulargewicht von $30\,500 \pm 10\%$ (Abb. 12).

7.4.3. Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Für die Messung dieser Größe wurde eine Chromatofokussierung nach SLUYTERMAN (1978) verwendet. Die genauen Chromatographiebedingungen sind unter II.B.4. geschildert. Die Vinorin-Synthase wurde als symmetrisches Aktivitätsmaximum bei einem pH-Wert von 4.4 eluiert.

7.4.4. Einfluß der Substratkonzentration auf die Aktivität der Vinorin-Synthase

Eine Konzentrationsabhängigkeit für 16-epi-Vellosimin wurde unter Standardbedingungen (III.B.7.2.2.) in Gegenwart von 5 pkat Vinorin-Synthase und 0.1 mM Acetyl-CoA gemessen. Abbildung 52 zeigt eine Auswertung der Umsatzraten nach MICHAELIS-MENTEN und LINEWEAVER-BURK. Für 16-epi-Vellosimin ergibt sich eine MICHAELIS-Konstante von $19.4\ \mu\text{M}$ bei einer maximalen Umsatzrate von 5 pkat.

Acetyl-CoA wurde unter gleichen Bedingungen in einem Konzentrationsbereich von $2.5\text{--}100\ \mu\text{M}$ variiert bei einer konstanten Polyneuridinaldehydmenge ($100\ \mu\text{M}$). Wie aus Abbildung 53 zu entnehmen ist, wurde ein K_m -Wert von $64\ \mu\text{M}$ gemessen. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit betrug 4.4 pkat.

Da bei diesen Ansätzen 16-epi-Vellosimin jeweils durch die PNA-Esterase gebildet wurde, mußte ein Einfluß dieses Enzyms auf die Substratabhängigkeit ausgeschlossen werden. Eine Wiederholung der Experimente in Gegenwart von 20 und 80 pkat

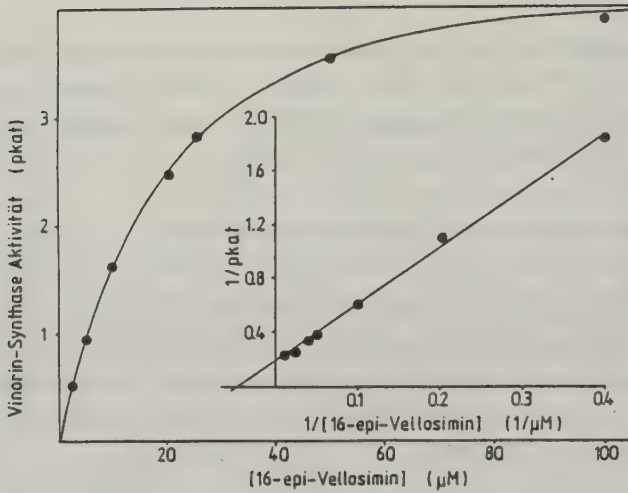


Abb. 52: Einfluß der 16-epi-Vellosimin-Konzentration auf die Aktivität der Vinorin-Synthase
 K_m : 19.4 μM V_{max} : 5 pkat

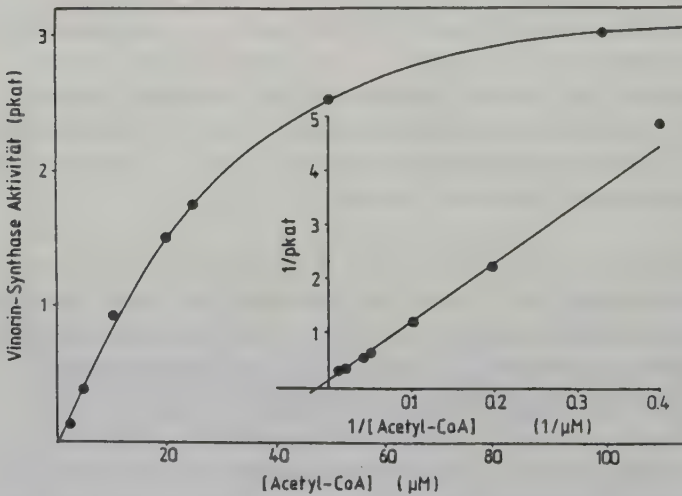


Abb. 53: Einfluß der Acetyl-CoA-Konzentration auf die Aktivität der Vinorin-Synthase
 K_m : 64 μM V_{max} : 4.4 pkat

PNA-Esterase lieferte jedoch dieselben kinetischen Daten.

7.4.5. Substratspezifität der Vinorin-Synthase

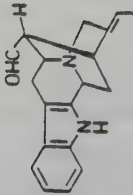
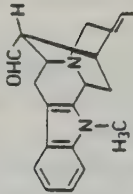
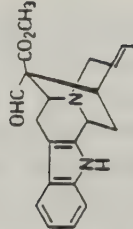
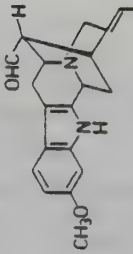
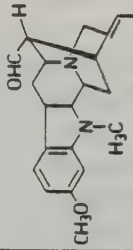
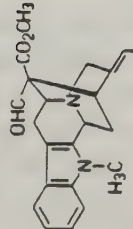
Wie die chemischen Untersuchungen von BARTLETT et al. (1963) gezeigt hatten, ist die Knüpfung der C-7, C-17 Bindung unter sauren Bedingungen unabhängig vom Vorhandensein einer Carboxymethylgruppe an C-16 des Ausgangsproduktes oder einer Methylierung an N₉. Vom biosynthetischen Standpunkt aus war es wesentlich zu überprüfen, ob dies auch für die enzymatische Reaktion zutrifft.

In Tabelle 13 sind die eingesetzten Substrate sowie die gemessenen Umsatzraten aufgelistet. Polyneuridinaldehyd und Voachalotinaldehyd wurden synthetisiert wie unter II.B.1.5. und II.B.1.8. dargestellt, die anderen Substrate stammten aus den genannten Quellen. Die stereochemische Reinheit von Gardneral und N₉-Methylgardneral wurde vor den Experimenten durch ¹H-NMR bestätigt, Deoxyajmalal A erwies sich bei dieser Analyse als ein Gemisch aus Deoxyajmalal A und Deoxyajmalal B im Verhältnis 6.5/3.5. Die Messungen erfolgten unter Standardbedingungen (ohne PNA-Esterase) in Gegenwart von 5 pkat Enzym und 100 µM Acetyl-CoA, die Substratkonzentration wurde im Bereich von 2.5-100 µM gewählt.

Es wurden nur 16-epi-Vellosimin und Gardneral umgesetzt. Gardneral wies einen doppelt so großen K_m-Wert auf wie 16-epi-Vellosimin. Das Zyklisierungsprodukt aus Gardneral und Acetyl-CoA wurde dünnschichtchromatographisch gereinigt (Fließmittelsystem D, II.B.2.1.) und spektroskopisch analysiert.

UV λ_{max}: 268 nm, 228 nm.

MS m/z (rel. Int. %): 364(M⁺, 25), 363(M⁺-H, 10), 321(59),
305(21), 212(24), 198(100), 183(12),
155(12).

Substrat	K_m (μM)	V_{max} (μkat)	Substrat	V_{max} (μkat)	Substrat	V_{max} (μkat)
	19.4	5.0		0		0
	39.0	4.3		0		0

Tab. 13: Substratspezifität der Vinorin-Synthase

Diese Daten sprechen eindeutig für 11-Methoxyvinorin, eine Verbindung, die bisher als Naturstoff noch nicht beschrieben wurde.

Außer Acetyl-CoA wurden noch weitere CoA-Ester wie Malonyl-CoA, Benzoyl-CoA, Coumaryl-CoA und Oleoyl-CoA eingesetzt, um die Spezifität der Vinorin-Synthase auch für das zweite Substrat näher zu charakterisieren. Diese Experimente waren in soweit von Bedeutung, als unter den Alkaloiden der Ajmalin-gruppe Verbindungen auftreten, die an C-17 mit einem Benzoyl- oder Cinnamoylrest verestert sind (z.B. 17-O-Trimethoxybenzoylajmalin oder 17-O-Trimethoxycinnamoylvincamajin). Die eingesetzten CoA-Ester wurden von der Vinorin-Synthase weder umgesetzt, noch zeigten sie eine Beeinflussung der Enzymreaktion als kompetitiver Hemmstoff.

7.4.6. Untersuchungen zum Mechanismus der Vinorin-Synthase-Reaktion

Nach den bisherigen Vorstellungen (KOSKINEN und LOUNASMAA, 1983, Abb. 6) sollte das erste Alkaloid mit Ajmalingrundgerüst ein 17-Hydroxyindolenin sein, das dann im weiteren Verlauf der Biosynthese durch andere Enzyme an der 4₁-Position reduziert oder an der C-17 Hydroxylgruppe acetyliert werden kann. Deshalb wurde untersucht, ob sich bei der Bildung von Vinorin Hinweise für die Existenz eines solchen Intermediats und damit für die Beteiligung zweier Enzyme an dieser Reaktion finden lassen.

Um das postulierte Zwischenprodukt abzufangen, wurden 16-epi-Vellosimin und Gardneral mit 16fach angereicherter Vinorin-Synthase bei unterschiedlichen pH-Werten in Gegenwart von NaBH₄ inkubiert. Es konnte zwar gezeigt werden, daß diese Aldehyde bei sauren pH-Werten (unter pH 4) spontan zyklisieren, aber bei physiologischen pH-Werten ließ sich auch nach Zugabe von Enzym kein Reduktionsprodukt vom Ajmalin-Typ akkumulieren. Versuche, die gesuchte Verbindung durch Acetylierung zu stabilisieren, schlugen ebenfalls fehl.

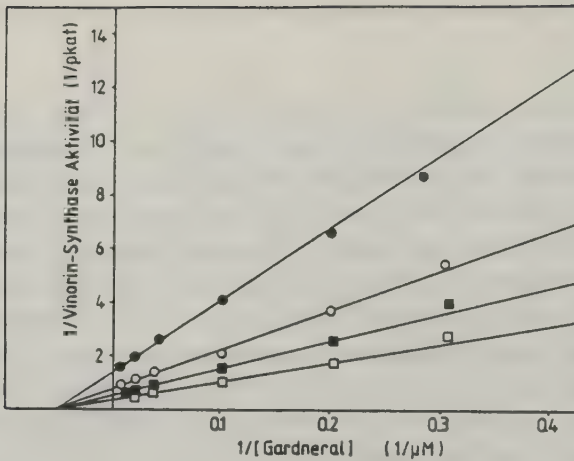


Abb. 54: Reziproke Auftragung der Vinorin-Synthase-Aktivität in Abhängigkeit von der Gardneralkonzentration mit 10 μM (●), 25 μM (○), 50 μM (■) und 100 μM (□) Acetyl-CoA

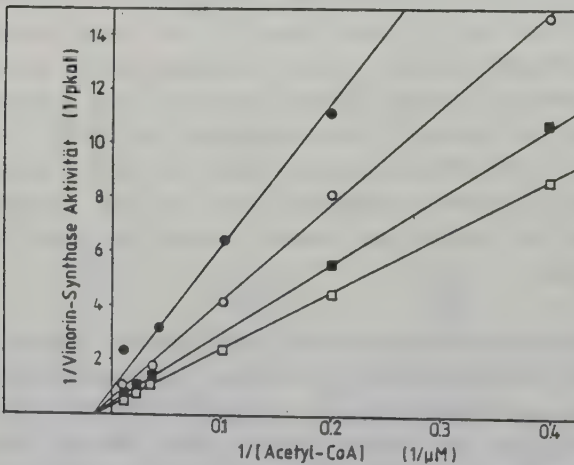


Abb. 55: Reziproke Auftragung der Vinorin-Synthase-Aktivität in Abhängigkeit von der Acetyl-CoA-Konzentration mit 5 μM (●), 10 μM (○), 25 μM (■) und 50 μM (□) Gardneral

Zusätzlich zur chemischen Derivatisierung von Zwischenprodukten können kinetische Untersuchungen wichtige Hinweise auf den Mechanismus einer Enzymreaktion geben. Dies gilt besonders für Enzymreaktionen mit zwei oder mehr Substraten. Eine Messung der Enzymaktivität bei unterschiedlichen Substratverhältnissen ermöglicht z.B. eine Unterscheidung zwischen Enzymreaktionen, bei denen beide Substrate gleichzeitig am aktiven Zentrum gebunden sein müssen (ternärer Komplex) und solchen Reaktionen, bei denen die Substrate nacheinander vom Enzym umgesetzt werden. Hemmstudien mit den Produkten der Enzymreaktion können zusätzlich Aufschluß über die Reihenfolge der Substratbindung geben. Bei den im folgenden erläuterten Experimenten wurde als Substrat statt 16-epi-Vellosimin Gardneral verwendet, da dieses Alkaloid in Lösung wesentlich stabiler ist und so eine konstante Substratkonzentration während der Messung garantiert.

Als erstes wurde unter Standardbedingungen (5 pkat Vinorin-Synthase) bei Konzentrationen von 10, 25, 50, und 100 μM Acetyl-CoA je eine Substratabhängigkeit für Gardneral aufgenommen. Derselbe Versuch wurde für Acetyl-CoA bei konstanten Gardneralkonzentrationen (5, 10, 25 und 50 μM) wiederholt. Wie die Abbildungen 54 und 55 belegen, erhält man bei einer reziproken Auftragung der Meßergebnisse je eine Geraden-schar, die sich in einem Punkt schneidet. Dies ist ein starkes Indiz für die Existenz eines ternären Komplexes bei der Vinorin-Synthase-Reaktion.

Versuche zur Endprodukthemmung wurden nur mit CoA durchgeführt, da die erforderlichen Konzentrationen für das zweite Produkt bei der schlechten Wasserlöslichkeit des Alkaloids nicht erreicht werden konnten. In Gegenwart von 0, 0.5 und 2 mM CoA sowie 0.1 mM des zweiten Substrates wurde die Enzymaktivität bei unterschiedlichen Konzentrationen von Acetyl-CoA oder Gardneral bestimmt. Für beide Substrate tritt eine kompetitive Hemmung auf, wobei sich in Bezug auf Gardneral (Abb. 56) eine Inhibitorkonstante von 72.6 μM und bezüglich Acetyl-CoA (Abb. 57) eine Inhibitorkonstante von 435 μM er-

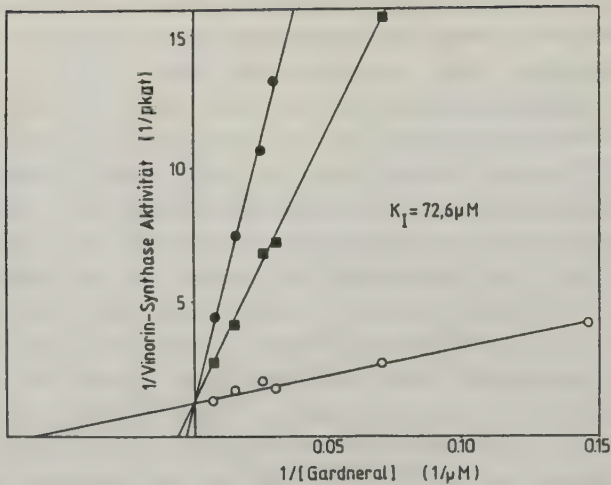


Abb. 56: Reziproke Auftragung der Vinorin-Synthase-Aktivität in Abhängigkeit von der Gardneralkonzentration mit 0 mM (○), 0.5 mM (■) und 2 mM (●) CoA

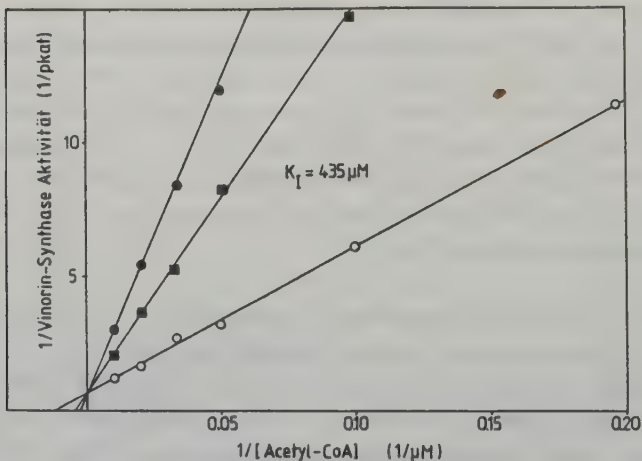


Abb. 57: Reziproke Auftragung der Vinorin-Synthase-Aktivität in Abhängigkeit von der Acetyl-CoA-Konzentration mit 0 mM (○), 0.5 mM (■) und 2 mM (●) CoA

rechnet. Diese Daten lassen sich mit einem typischen Enzymmechanismus für eine Zweisubstratreaktion, und zwar einem Zufallsmechanismus (Random BiBi rapid equilibrium) vereinbaren, wie er z.B. für die Hexokinase beschrieben ist (FROMM, 1975). Bei diesem Enzymmechanismus ist die Bildung eines ternären Komplexes notwendig, damit die Enzymreaktion stattfinden kann. Die Bindung der beiden Substrate an das aktive Zentrum erfolgt jedoch nicht in einer bestimmten Reihenfolge, sondern unabhängig voneinander.

Eine weitere Methode, die wichtige Erkenntnisse über den Ablauf einer Enzymreaktion liefern kann, ist die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit. Wie jede chemische Reaktion wird auch die enzymatische Produktbildung durch eine Erhöhung der Temperatur beschleunigt. Im Gegensatz zu einer normalen chemischen Reaktion kommt es jedoch hier nach Überschreiten eines Temperaturoptimums zu einer thermischen Denaturierung des Proteins und damit zu einer Verringerung der Umsatzrate. Eine Auftragung der logarithmischen Reaktionsgeschwindigkeit vor dem Erreichen des Temperaturoptimums gegen die reziproke absolute Temperatur ergibt eine Gerade, aus der die Aktivierungsenergie der enzymatischen Reaktion abgelesen werden kann. Dies gilt jedoch nicht für Reaktionen, an denen mehrere Geschwindigkeitskonstanten beteiligt sind. Hier kommt es zu Sprüngen und Diskontinuitäten in der Auftragung, wenn sich bei erhöhter Temperatur der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ändert (BIOSCA et al., 1983).

Je 1 μ kat Vinorin-Synthase wurde mit je 10 nMol Gardneral und 10 nMol Acetyl-CoA unter Standardbedingungen bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert und die Umsatzrate bestimmt. In Abbildung 58 A ist die Temperaturoptimumskurve dargestellt. Für eine Auftragung nach ARRHENIUS (RAUEN, 1964) wurden alle Meßwerte vor dem Einsetzen der thermischen Inaktivierung verwendet (Abb. 58 B). Es ergibt sich für diese Enzymreaktion eine optimale Umsatzrate bei einer Temperatur von 35°C. Aus der graphischen Darstellung nach ARRHENIUS läßt sich ein

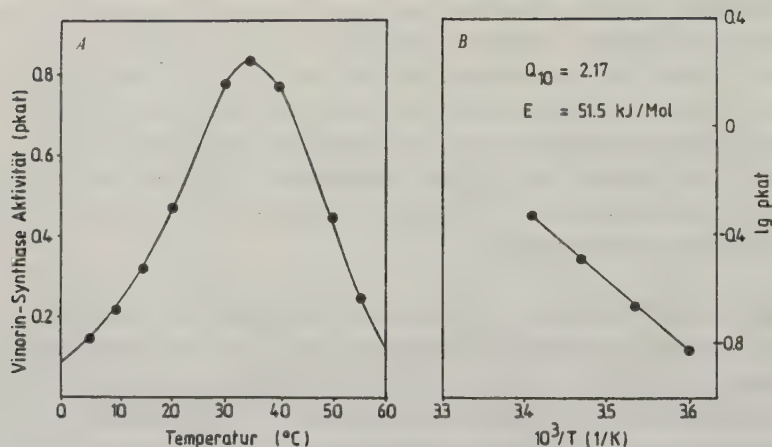


Abb. 58 A: Temperaturabhängigkeit der Vinorin-Synthase

Abb. 58 B: ARRHENIUS-Auftragung der Temperaturabhängigkeit

Q_{10} -Wert von 2.17 und eine Aktivierungsenergie von 51.5 kJ/Mol entnehmen. Diese Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit weist bis zu einer Temperatur von 30°C einen geradlinigen Verlauf auf.

Weder die Substratabhängigkeit noch die Temperaturabhängigkeit der Vinorinbildung lassen demnach den Schluß zu, daß an dieser Reaktion eine zweite Enzymaktivität beteiligt ist, welche die Synthese von Deacetylvinorin katalysiert.

7.4.7. Untersuchungen zur Regulation der Vinorin-Synthase

Wie bei der PNA-Esterase und bei der Vellosoimin-Reduktase wurde auch für dieses Enzym der Einfluß von Sarpagin und Ajmalin auf die Aktivität untersucht. Standardansätze in Gegenwart von 0.1, 0.2, 0.5 und 1.0 mM Sarpagin oder Ajmalin wiesen keine signifikanten Aktivitätsunterschiede zu Kontrollwerten auf.

8. Fütterungsexperimente mit [^3H -Acetyl] Vinorin

Wie die vorhergehenden Experimente beweisen, wird Vinorin als erstes Alkaloid mit dem Grundgerüst des Ajmalins durch ein spezifisches Enzym aus 16-epi-Vellosimin gebildet. Vinorin sollte daher eine Vorstufe für alle Alkaloide dieses Typs sein. Aufgrund der Acetylajmalan-Esterase-Aktivität blieben jedoch in vitro Experimente zu dieser Fragestellung ohne Ergebnis. Deshalb wurde versucht, durch Fütterung von radioaktiv markiertem Vinorin an R. serpentina Zellkulturen diesen Nachweis zu führen. Um sicher zu sein, daß nicht etwa ein Zerfallsprodukt des Vinorins (z.B. Vellosimin), sondern das intakte Molekül in Alkaloide wie Vomilenin oder 17-O-Acetylajmalin eingebaut wird, mußte eine Verbindung eingesetzt werden, die an der Acetylgruppe radioaktiv markiert war. Die Synthese von [^3H -Acetyl] Vinorin ist unter II.B.1.6. beschrieben.

15 μCi [^3H -Acetyl] Vinorin (31 mCi/mMol) wurden, wie unter III.B.6. für Deoxysarpagin detailliert erläutert, an 7 Tage alte Zellkulturen von R. serpentina verfüttert. Nach 24 Stunden wurde das Gewebe abfiltriert und mit 75 ml Essigester extrahiert. Die organische Phase wurde eingengt und dünn-schichtchromatographisch in den Fließmittelsystemen A und B (II.B.2.1.) aufgetrennt. Abbildung 59 zeigt eine Auswertung der Radioaktivitätsverteilung nach Chromatographie in Fließmittel B. Nur 20% der eingesetzten Radioaktivität konnte aus dem Gewebe extrahiert werden, während der Rest nicht mehr in der Alkaloidfraktion lokalisiert war und demzufolge in der wäßrigen Phase verblieb. Von der eingebauten Radioaktivität fanden sich 4% in 17-O-Acetylnorajmalin, 12% im Ausgangsprodukt Vinorin, 8% in Vomilenin und 44% in 17-O-Acetylajmalin wieder. Um die Position der radioaktiven Markierung zu beweisen, wurde 17-O-Acetylajmalin isoliert und mit einer 20%igen Natriummethylatlösung umgesetzt. Das entstandene Ajmalin enthielt keine Isotopenmarkierung mehr, während diese bei einer Acetylierung von 17-O-Acetylajmalin zu

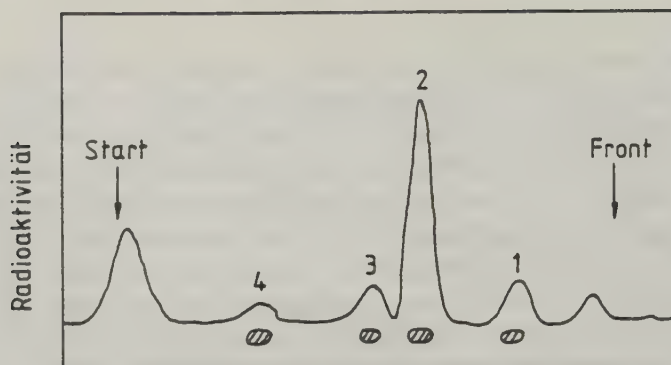


Abb. 59: Dünnschichtchromatographische Auftrennung eines Essigesterextraktes von R. serpentina nach Fütterung von tritiummarkiertem Vinorin

- 1: Vinorin
- 2: 17-O-Acetyljmalin
- 3: Vomilenin
- 4: 17-O-Acetylnorajmalin

17,21-O-Diacetyljmalin erhalten blieb.

Im Gegensatz zu den Fütterungsversuchen mit 10-Deoxysarpagin konnten mit Vinorin nur erheblich geringere Einbauraten erzielt werden. Dies ist sicherlich auf die Acetyljmalan-Esterase-Aktivität zurückzuführen. Trotzdem verdeutlichen die Experimente, daß diese Verbindung die Vorstufe für Alkaloide des Ajmalin-Typs darstellt, die an C-21 hydroxyliert sind.

9. Zellfreie Synthese von Ajmalin

Die in vivo Experimente mit Vinorin führten nicht nur zu einem Einbau in das chemisch am nächsten stehende Vomilenin (21-Hydroxyvinorin), sondern die bei weitem höchste Inkorporationsrate läßt sich beim 17-O-Acetyljmalin nachweisen.

Es erschien deshalb wahrscheinlich, daß erst ein an C-21 hydroxyliertes Indolenin das geeignete Substrat für eine enzymatische Reduktion zum Ajmalin bildet und diese Hydroxylierungsreaktion den zellfreien Umsatz von Vinorin limitiert. Daher wurde untersucht, ob Vomilenin mit einem Proteinrohextrakt zu Ajmalin umgesetzt werden kann.

6 ml eines Proteinextraktes aus *R. serpentina* (30 mg Protein) wurden zusammen mit 0.8 μ Mol Vomilenin und 12 μ Mol NADPH für 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit Essigester ausgezogen und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (Fließmittel E, II.B.2.1.). Bei einem R_f -Wert von 0.5 befand sich eine Substanz, die nach Besprühen mit einer 5%igen Lösung von Ammoniumcersulfat in 85%iger Phosphorsäure durch ihre orange Färbung auffiel. Ein Massenspektrum dieser Verbindung ergab folgende Fragmente.

MS m/z (rel. Int. %): 312(M^+ , 92), 311(M^+-H , 46), 297(21),
283(63), 186(50), 182(52), 168(100).

Dieses Zerfallsmuster sowie die UV-Maxima bei 238 und 286 nm sind charakteristisch für Norajmalin (MAJUMDAR et al., 1973).

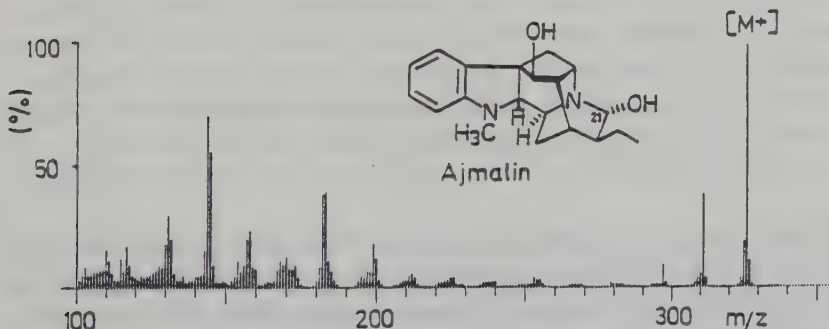


Abb. 60: Massenspektrum von enzymatisch gebildetem Ajmalin

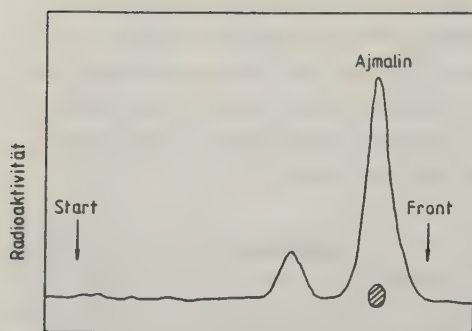


Abb. 61:

Synthese von [^{14}C -Methyl]-
Ajmalin aus Vomilenin
durch R. serpentina Roh-
extrakt

Vomilenin ist also enzymatisch an der Δ_1 - und der Δ_{19} -Doppelbindung reduziert worden. Um zu klären, ob auch eine Methylierung dieser Verbindung zum Ajmalin unter zellfreien Bedingungen möglich ist, wurde derselbe Ansatz wiederholt, aber $10 \mu\text{Mol}$ S-Adenosylmethionin bzw. $1 \mu\text{Mol}$ [^{14}C -Methyl]S-Adenosylmethionin hinzugefügt. Diese Ansätze wurden wie oben beschrieben aufgearbeitet und chromatographiert. Als Produkt wurde eine Substanz isoliert, deren Massenspektrum in Abbildung 60 dargestellt ist. Es handelt sich eindeutig um Ajmalin. Bei der Aufarbeitung des radioaktiven Ansatzes ließen sich 88% der ^{14}C -Markierung in die organische Phase überführen. Eine quantitative Auswertung der Radioaktivitätsverteilung auf dem Chromatogramm (Abb. 61) zeigt, daß hiervon 78% in Ajmalin eingebaut wurde. Identische Inkubationsansätze in Gegenwart von 200 nMol Norajmalin führten ebenfalls zu einer Akkumulation von Ajmalin. Eine N_a -Methylierung kann also als letzter Schritt in der Biosynthese des Ajmalins erfolgen.

In Abbildung 62 ist die in vitro nachgewiesene Biosynthesesequenz vom Vomilenin zum Ajmalin dargestellt. Sie besteht aus einer Acetyljajmalan-Esterase, zwei reduzierenden Enzymaktivitäten und einer Norajmalin-Methyltransferase. Die Reduktion der beiden Doppelbindungen muß stereospezifisch erfolgen, da die möglichen Isomere massenspektroskopisch leicht vom Ajmalin zu unterscheiden sind. Eine α -Stellung

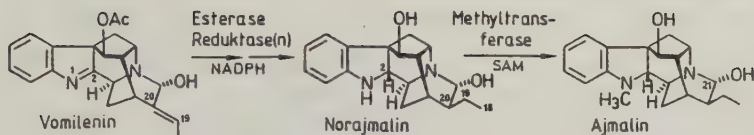


Abb. 62: Zellfreie Biosynthese von Ajmalin aus Vomilenin durch Rohextrakt aus R. serpentina

des Wasserstoffatoms an C-2 führt zu einem äußerst stabilen Bruchstück mit der Masse 166, wogegen das Fragment 182 m/z kaum noch auftritt (HESSE, 1974). Eine Änderung der Stereochemie an C-20 verringert die Häufigkeit des Fragments 311 m/z ($M^+ - CH_3$).

Von den Iminium-Cathenamin-Reduktasen ist bekannt, daß sie relativ unspezifisch sind bezüglich des Cofaktors (TREIMER und ZENK, 1978). Sowohl NADH als auch NADPH können als Reduktionsmittel dienen. Um Aufschluß über die Cofaktorspezifität der Reduktasen zu erhalten, die an der Biosynthese des Ajmalins beteiligt sind, wurden je 0.2 μ Mol Vomilenin in Gegenwart von 1.25 ml Rohextrakt (8.6 mg Protein), 3 μ Mol NADH oder NADPH und 5 μ Mol S-Adenosylmethionin in 3 ml 100 mM Phosphatpuffer pH 7 für 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Ajmalinbildung wurde mit dem von ARENS (1979) entwickelten Radioimmunttest gemessen. Nur mit NADPH konnte eine Bildung von 15.6 nMol (7.8% Umsatz) Ajmalin nachgewiesen werden. Dieses Enzymsystem ist also genauso wie die Geissoschizin-Dehydrogenase und die Vellosimin-Reduktase äußerst Cofaktorspezifisch.

Einen zusätzlichen Beweis dafür, daß bei der Bildung von Ajmalin aus Vomilenin zwei Wasserstoffatome aus NADPH in das Molekül eingeführt werden, lieferte ein Experiment mit NADPD. Der deuterierte Cofaktor wurde enzymatisch durch Oxidation von D₆-Äthanol hergestellt.

415 nkat Alkohol-Dehydrogenase aus Leuconostoc mesenteroides

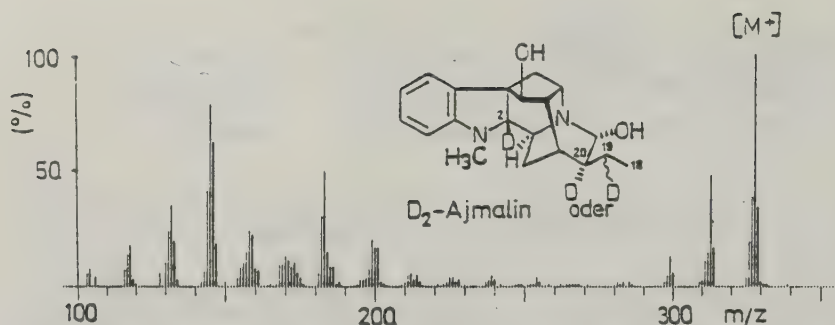


Abb. 63: Massenspektrum von enzymatisch gebildetem D₂-Ajmalin

(EC 1.1.1.2.) und 25 μMol NADP⁺ wurden in 2 ml 100 mM Phosphatpuffer pH 7.5 gelöst und 44 μMol Semicarbazid hinzugegeben, um den gebildeten Acetaldehyd abzufangen. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.54 mMol D₆-Äthanol gestartet. Die Zunahme der Extinktion bei 340 nm wurde verfolgt. Nach 15 Minuten war die Reaktion beendet und der Küvetteninhalt wurde zu einem Enzymsatz hinzugegeben, der 19 ml Rohextrakt aus *R. serpentina* (8.8 mg Protein/ml), 19 μMol S-Adenosylmethionin und 2.9 μMol Vomilenin enthielt. Nach 2 Stunden Inkubation bei 30°C erfolgte eine Extraktion mit Essigester und eine chromatographische Auftrennung des Ansatzes wie oben beschrieben. Abbildung 63 zeigt das Massenspektrum des gebildeten Ajmalins. Es ist eindeutig der Einbau von zwei Deuteriumatomen ($M^+ = 338$) festzustellen. Während sich ein Deuterium

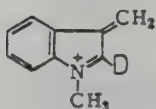


Abb. 64:

Fragment 144 m/z bzw. 145 m/z bei einem Einbau von Deuterium in die 2 β -Position des Ajmalins

an C-2 befindet (m/z 144—145, Abb. 64), kann massenspektroskopisch nicht entschieden werden, ob das zweite Deuteriumatom an C-19 oder C-20 lokalisiert ist. Das Fragment m/z 297

($M^+ - C_2H_5$), das zur Klärung dieses Problems herangezogen werden könnte, wird von dem Bruchstück m/z 297 ($M^+ - CHO$) überdeckt (BIEMANN et al., 1964).

10. Alkaloidbildung und Enzyminduktion während des Wachstums einer statischen Suspensionskultur von R. serpentina

Pflanzliche Suspensionskulturen verhalten sich in ihrem Wachstum wie Submerskulturen von Mikroorganismen. Nach dem Überführen in ein neues Medium wird nach einer kurzen Anlaufphase die maximale Teilungsrate erreicht, die zu einem exponentiellen Anwachsen der Zellmasse führt. Mit zunehmendem Verbrauch der Nährstoffe nimmt die Teilungsrate wieder ab, bis das Wachstum schließlich zum Erliegen kommt. Die Sekundärstoffproduktion ist nicht zwangsläufig mit dem Wachstum der Zellkultur korreliert, sondern kann durchaus erst einsetzen, wenn die stationäre Phase erreicht ist (ZENK et al., 1977). Auf jeden Fall müssen erst die an der Biosynthese beteiligten Enzyme induziert werden, bevor eine Zunahme der entsprechenden Inhaltsstoffe erfolgen kann. Aus diesem Grunde wurde die Änderung der im vorhergehenden Teil der Arbeit beschriebenen Enzymaktivitäten und des Alkaloidgehaltes während des Wachstums einer statischen Kultur von R. serpentina verfolgt.

Für diese Kinetik wurden je 20 ml Zellmasse von R. serpentina Suspensionskulturen in 1 Liter Erlenmeyerkolben mit 250 ml LS-Medium überführt und unter den in II.A.1.2. beschriebenen Bedingungen kultiviert. In Abständen von 2-4 Tagen wurden 2 Kolben abgeerntet und der Zuckergehalt im Medium mit einem Refraktometer der Firma Zeiss bestimmt. Je 5 g FG des abgenutzten Gewebes wurden mit 50 ml Essigester und 1 ml 1 M Boratpuffer pH 8.5 12 Stunden bei 4°C gerührt. Die organische Phase wurde eingeeengt und der Gehalt an Ajmalin und Vo-

milenin durch quantitative Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen gemessen (II.B.5.). Eine Eichgerade für Vomilenin und Ajmalin, die unter diesen Bedingungen aufgenommen wurde, war im Bereich von 0-5 μg linear. Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden je 10 g Gewebe in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufgeschlossen (II.B.9.). Die Aktivität von Vellosimin-Reduktase, Strictosidin-Synthase, PNA-Esterase und Acetylajmalan-Esterase wurde unter Standardbedingungen gemessen. Um auch die Methylierung von Norajmalin quantitativ erfassen zu können, wurde für die Norajmalin-Methyltransferase folgender Nachweis entwickelt.

In 0.1 ml 100 mM Boratpuffer pH 8 wurden 2 nMol Norajmalin und 0.4 nMol [^{14}C -Methyl]S-Adenosylmethionin (59.5 mCi/mMol) mit der jeweiligen Enzympräparation für 1 Stunde bei 30°C inkubiert. Die Ansätze wurden mit je 0.4 ml Essigester extrahiert, wobei Alkaloide in die organische Phase übergehen, während unverbrauchtes S-Adenosylmethionin in der wässrigen Phase verbleibt. Durch Messen der Radioaktivität in der Essigesterphase konnte die Ajmalinbildung bestimmt werden.

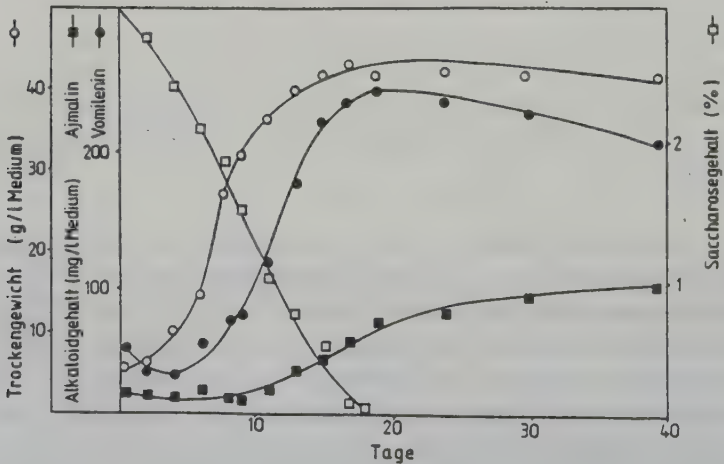


Abb. 65: Änderung des Alkaloidgehaltes (Ajmalin/Vomilenin) während des Wachstums von *R. serpentina* Suspensionskulturen

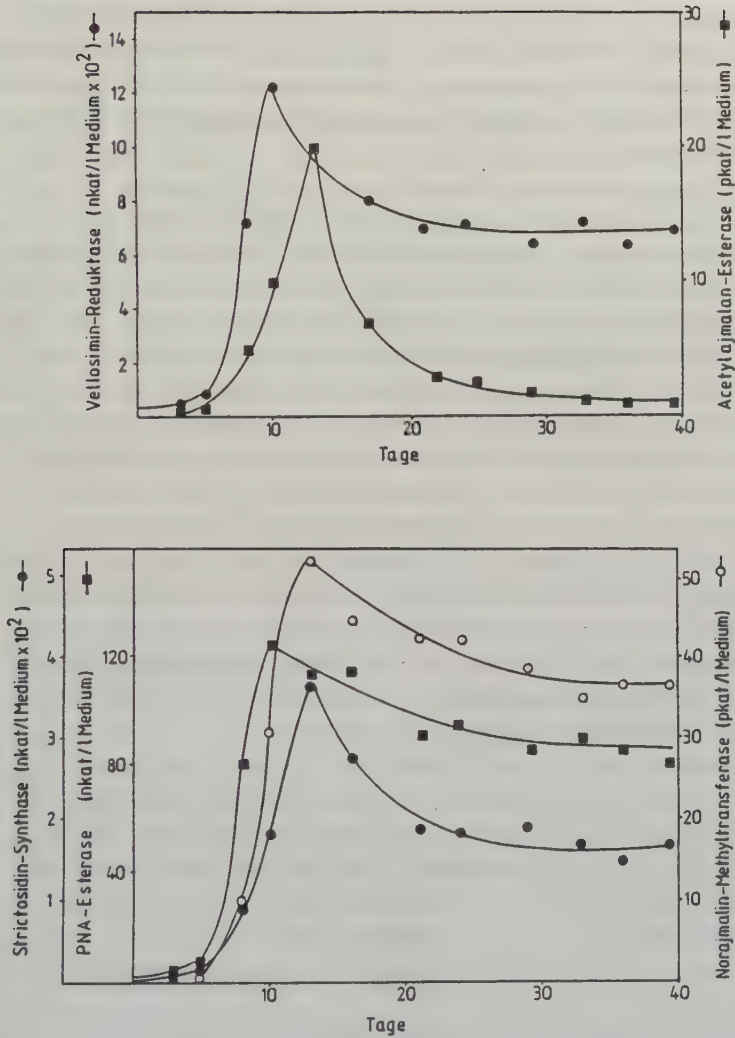


Abb. 66: Änderung der Enzymaktivitäten des Ajmalin/Sarpagin-Biosyntheseweges während des Wachstums von R. serpentina Suspensionskulturen

In Abbildung 65 ist die Änderung des Alkaloidgehalts und in Abbildung 66 die Änderung der gemessenen Enzymaktivitäten während des Wachstums von R. serpentina Suspensionskulturen dargestellt. Eine Bestimmung der Vinorin-Synthase-Aktivität war im Rohextrakt aufgrund der Acetylajmalan-Esterase(n) nicht möglich.

Das Wachstum der betrachteten Zellkultur ist nach etwa 17 Tagen beendet, zu diesem Zeitpunkt ist auch die Kohlenstoffquelle im Medium aufgebraucht. Die maximale Vomileninproduktion wird jedoch erst nach 20 Tagen erreicht und der Ajmalingehalt steigt bis zum Ende der Kinetik hin an. Alle getesteten Enzyme von der Strictosidin-Synthase bis zu der Norajmalin-Methyltransferase erreichen zwischen dem 10. und dem 13. Wachstumstag ihre maximale Aktivität. Diese nimmt dann bei allen Enzymen, ausgenommen der Acetylajmalan-Esterase(n), nur recht langsam ab, so daß nach 40 Tagen noch etwa 50-70% des Maximalwertes nachzuweisen ist. Diese simultane Induktion sämtlicher getesteter Enzymaktivitäten und die zeitliche Verzögerung im Anstieg des Alkaloidgehaltes spricht eindeutig dafür, daß diese Enzyme zu einem Biosyntheseweg gehören, der zur Bildung von Alkaloiden des Ajmalin/Sarpagin-Typs führt.

IV. DISKUSSION

Ein generelles Problem bei der Aufklärung von Biosynthesewegen ist die Unterscheidung zwischen einer Vorstufe und einem Zwischenprodukt. Während als Vorstufe jede Verbindung gilt, die nach Fütterung in einen Inhaltsstoff eingebaut wird, entsteht ein Zwischenprodukt im Laufe einer Biosynthesesequenz und wird dann weiter zum Endprodukt umgesetzt (KINDL und WÖBER, 1975). Die meisten der bisher beschriebenen Enzymreaktionen sind jedoch reversibel (DIXON und WEBB, 1966), so daß ein Biosyntheseweg prinzipiell in einer unphysiologischen Richtung ablaufen kann, z.B. wenn eine in vivo applizierte Substanz zu hohe Konzentrationen erreicht. Deshalb ist die Stellung einer Verbindung innerhalb eines Biosyntheseschemas allein durch Fütterungsexperimente nicht zu klären. Aber auch in vitro Experimente mit Proteinrohextrakten, die ein Gemisch aus zahlreichen Enzymen darstellen, können aus den gleichen Gründen zu Fehlschlüssen führen. So schlugen LEE et al. (1979) Geissoschizin als Intermediat für die Biosynthese der Heteroyohimbin-Typ Alkaloide vor, da eine Inkubation von [^{14}C]Tryptamin, [^3H -Aryl]Geissoschizin, Secologanin, NADP^+ und NADPH mit einem Rohextrakt aus C. roseus Kalluskulturen zur gleichzeitigen Bildung von doppelt markiertem Geissoschizin und Ajmalicin führte. Nach den Vorstellungen dieser Autoren entsteht über die Zwischenstufe Strictosidin das Alkaloid Geissoschizin durch enzymatische Reduktion des bis dahin postulierten 4,21-Dehydrogeissoschizins. Geissoschizin sollte dann durch Zyklisierung des E-Ringes in Ajmalicin und seine Isomere übergehen.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, erfolgt der in vitro und in vivo Umsatz von [$5\text{-}^{14}\text{C}, 21\alpha\text{-}^3\text{H}$]Geissoschizin zu Ajmalicin jedoch unter fast vollständigem Ausbau der Tritiummarkierung. Dieser Befund macht deutlich, daß für den Übergang von Geissoschizin zu Alkaloiden der Heteroyohimbin-Gruppe ein an C-21 dehydriertes Zwischenprodukt vorausgesetzt werden muß. Aus C. roseus Suspensionskulturen konnte dement-

sprechend ein bisher unbekanntes, spezifisches Enzym isoliert und charakterisiert werden, das NADP^+ -abhängig den 21 α -Wasserstoff aus dem Geissoschizinmolekül ausbaut (PFITZNER und STÖCKIGT, 1982). Das Produkt dieser Enzymreaktion ist 4,21-Dehydrogeissoschizin und wurde als [21-D] Tetrahydroalstonin und als Glycerinaddukt in Ansätzen mit Rohextrakt aus R. serpentina abgefangen. Geissoschizin ist somit kein obligates Intermediat für die Biosynthese der Ajmalicinisomere, sondern wird erst über das Zwischenprodukt 4,21-Dehydrogeissoschizin in Alkaloide mit diesem Grundskelett umgewandelt.

Ausgehend von den geschilderten Ergebnissen kann aus den Befunden von LEE et al. (1979) gefolgert werden, daß es sich bei der enzymatischen Geissoschizinsynthese um eine reversible Reaktion handelt und deshalb eine zentrale Bedeutung des Geissoschizins für die Biosynthese des Ajmalicins vorge-täuscht wurde. Diese Hypothese konnte mit einer Enzympräparation aus C. roseus nicht überprüft werden, da hier aufgrund der Konkurrenz zwischen der Bildung von Geissoschizin und Alkaloiden der Heteroyohimbin-Klasse keine Bestimmung der maximal erreichbaren Geissoschizin-Syntheserate möglich war. Aus R. serpentina ließ sich jedoch ein Enzymsystem isolieren, das genauso wie ein Rohextrakt aus C. roseus die Enzyme Strictosidin-Synthase, Strictosidin-Glucosidasen und Geissoschizin-Dehydrogenase enthielt, dagegen aber nur eine vernachlässigbar geringe Iminium-Cathenamin-Reduktase-Aktivität aufwies. Mit diesem Enzymgemisch wurden nun sowohl die Bildung von Geissoschizin aus Tryptamin und Secologanin, als auch die Dehydrierung von Geissoschizin zu 4,21-Dehydrogeissoschizin untersucht. Die direkte Reduktion von 4,21-Dehydrogeissoschizin zu Geissoschizin konnte zwar demonstriert werden, war aber für quantitative Experimente nicht geeignet, da das Substrat in Lösung spontan zu den Cathenaminisomeren zyklisiert. Ein Vergleich der Maximalgeschwindigkeiten dieser Enzymreaktionen verdeutlicht, daß die Synthese von Geissoschizin (13.6 pkat/mg Protein) gegenüber der Dehydrogenase-Reaktion (0.4 pkat/mg Protein) stark bevorzugt ist. Andererseits liegen aber die MICHAELIS-Konstanten (K_m für Tryptamin

= 119 μ M, K_m für Geissoschizin = 90 μ M) und die pH-Optima (Geissoschizinbildung: pH-Optimum = 7.5, Geissoschizinoxidation: pH-Optimum = 7.5) für beide Reaktionen im gleichen Größenordnungsbereich. Bezogen auf die Biosynthese von Geissoschizin und von Alkaloiden der Heteroyohimbin-Gruppe lassen sich diese Ergebnisse folgendermaßen interpretieren. 4,21-Dehydrogeissoschizin nimmt eine Schlüsselrolle in der Biosynthese beider Alkaloid-Klassen ein. Im Gegensatz zur Iminium-Cathenamin-Reduktase-Aktivität, die NAD(P)H-abhängig die Bildung der Ajmalicinisomere katalysiert, ist die Geissoschizinsynthese reversibel und kann je nach dem vorhandenen Verhältnis von Substrat zu Produkt in beide Richtungen ablaufen.

Ausgehend von der Stufe des Geissoschizins sollte diese Zellkultur aus R. serpentina als Versuchsobjekt für die Aufklärung der Biosynthese von Alkaloiden der Ajmalin/Sarpagin-Gruppe dienen. Bevor jedoch erste in vitro Experimente in Angriff genommen wurden, mußte sichergestellt werden, daß die gewählten Kulturbedingungen auch zur Induktion der gesuchten Biosynthesesequenzen führten. Deshalb wurden die Alkaloide aus dieser Kultur isoliert und spektroskopisch identifiziert. Insgesamt wurden 14 Alkaloide gefunden, wobei 5 der Ajmalin-, 2 der Yohimbin-, 4 der Heteroyohimbin- und 3 der Sarpagin-Klasse angehörten (STÖCKIGT et al., 1981). Zusätzlich konnten noch Tetraphyllicin und 17-O-Acetyltetraphyllicin als Inhaltsstoffe nachgewiesen werden (U.PFITZNER, persönliche Mitteilung). Damit produziert die untersuchte Suspensionskultur von R. serpentina das breiteste Spektrum unterschiedlicher Alkaloide, das bisher für eine Gewebekultur beschrieben wurde. Die gefundenen Strukturtypen sind dieselben, die auch in differenzierten Pflanzen dieser Art auftreten (KÄHLER, 1970), wobei in beiden Fällen Alkaloide der Ajmalin-Gruppe die Hauptmenge der Alkaloidfraktion bilden. Allerdings ergeben sich bezüglich der isolierten Verbindungen aus den verschiedenen Alkaloidgruppen erhebliche Unterschiede. Vomilenin, Vinorin, 17-O-Acetyljajmalin, 17-O-Acetylnorajmalin, 3-Isoajmalicin, Alstonin, Vellosoimin und 10-Deoxysarpagin sind bisher noch

nicht aus R. serpentina Pflanzen isoliert worden, wobei 17-O-Acetylnorajmalin zum ersten Mal als Naturprodukt aufgefunden wurde. Diese Veränderung im Alkaloidspektrum von Suspensionskulturen im Vergleich zur Pflanze ist jedoch häufig zu beobachten (STÖCKIGT et al., 1982) und beruht offensichtlich darauf, daß die Sekundärstoffproduktion stark von den Kulturbedingungen und speziell vom Verhältnis der Pflanzenhormone im Medium abhängt (DEUS und ZENK, 1982). So können Verbindungen, die in der Pflanze als Spurenalkaloide auftreten und deshalb dem Nachweis entgehen, von der entsprechenden Zellkultur als Hauptalkaloid gebildet werden (STÖCKIGT et al., 1984). Das beste Beispiel ist das Indolalkaloid Vomilenin, das in der beschriebenen Submerskultur über 90% des Gesamtalkaloidgehaltes bildet (57 mg/l Medium, 0.2% Trockengewicht) und damit den für R. vomitoria Wurzeln gefundenen Wert um das 50fache überschreitet (HOFMANN und FREY, 1957). Ein zweiter Grund für die gefundenen Unterschiede im Alkaloidgehalt der Zellkulturen zum Pflanzenmaterial liegt sicherlich auch in der Instabilität einiger Alkaloide und insbesondere des Vomilenins begründet. So führt eine Extraktion des Gewebes mit heißem Methanol oder Äthanol zu einer Zerstörung dieser Verbindung. Auch im sauren oder basischen Milieu ist dieses Indolalkaloid äußerst instabil. HOFMANN und Mitarbeiter (TAYLOR et al., 1962) zeigten, daß sich Vomilenin unter sauren Bedingungen zu Perakin umlagert und führten deshalb die Isolation von Perakin aus R. vomitoria auf eine Artefaktbildung zurück. Bis auf Vinorin stimmen alle aus R. serpentina Suspensionskulturen isolierten Alkaloide in ihren spektroskopischen Daten mit den in der Literatur publizierten Werten überein. Obwohl die für das Vinorin registrierten UV-, MS-, IR- und ^1H -NMR-Spektren mit der von MEISEL et al. (1971) vorgeschlagenen Struktur in Einklang stehen, ergeben sich Differenzen bezüglich der optischen Drehung. Während für das isolierte Alkaloid ein $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -Wert von 29° gemessen wurde, konnten die genannten Autoren keine optische Aktivität nachweisen. Zur Klärung dieser Diskrepanz wurden alle spektroskopischen Messungen mit enzymatisch (PFITZNER und STÖCKIGT, 1983a) und chemisch synthetisiertem (nach KIANG et al.,

1966) Vinorin wiederholt und führten zu identischen UV-, MS-, ^1H -NMR- und $[\alpha]_D^{20}$ -Werten. Es kann nur vermutet werden, daß es sich bei der von MEISEL et al. (1971) aus Vinca minor isolierten Substanz um ein Racemat handelt.

Wie das Alkaloidspektrum belegt, werden in dieser Gewebekultur von R. serpentina Alkaloide mit dem Grundgerüst des Ajmalins produziert. Damit war das geeignete Untersuchungsobjekt zur Biosynthese einer Verbindungsklasse gefunden, die aufgrund ihres komplexen hexazyklischen Ringsystems schon früh Interesse seitens der organischen Chemie hervorgerufen hat (TAYLOR, 1965, 1968), aber über deren Bildung in der Pflanze nahezu nichts bekannt war. Die ersten zellfreien Experimente zur Biosynthese von Alkaloiden des Ajmalin/Sarpagin-Typs führten zur Identifizierung einer Enzymaktivität, die aus Polyneuridinaldehyd das Sarpaginalkaloid Vellosimin bildet. Dieses neue Enzym wurde Polyneuridinaldehyd-Esterase (PNA-Esterase) genannt. Wie detaillierte Untersuchungen dieser Reaktion zeigten (PFITZNER und STÖCKIGT, 1983b und c), ist das erste isolierbare Enzymprodukt 16-epi-Vellosimin, obwohl formal eine Carbonsäure mit β -ständiger Aldehydgruppe (Polyneuridinaldehydsäure) zu erwarten wäre. Die anschließende Epimerisierung von 16-epi-Vellosimin zu Vellosimin erfolgt spontan bereits unter milden physiologischen Bedingungen. Hemmstoffversuche zum Enzymmechanismus lieferten keinerlei Hinweise auf eine Decarboxylase-Aktivität der PNA-Esterase. Man muß folglich annehmen, daß auch dieser Schritt bei der Umwandlung von Polyneuridinaldehyd zu Vellosimin ohne Enzymwirkung abläuft. Eine spontane Decarboxylierung der intermediär entstandenen Carbonsäure ist durchaus vorstellbar, da sich ein als Produkt der CO_2 -Abspaltung gebildetes Carbanion in Form eines Enols stabilisieren kann. Nur durch den Einsatz von SH-Reagenzien konnte eine Beeinträchtigung der Polyneuridinaldehydspaltung erreicht werden. Freie Sulfhydrylgruppen sind offenbar für die Aktivität dieses Enzyms sehr wesentlich, da auch strukturell und damit in ihren Bindungseigenschaften unterschiedliche Modifizierungsreagenzien (PFITZNER, 1979) identische Inaktivierungskinetiken ergaben. Gestützt

wird dieser Befund auch durch die Tatsache, daß in Abwesenheit von MSH eine reversible Inaktivierung der PNA-Esterase auftritt. Wenn man in Betracht zieht, daß bei den geschilderten Hemmstoffexperimenten kein Nachweis für die Notwendigkeit eines Serinrestes oder eines Metallions zur katalytischen Aktivität dieses Enzyms erbracht werden konnte, so erscheint die Beteiligung einer Sulfhydrylgruppe an der Spaltung der Carboxymethylfunktion naheliegend. Außerdem ist gerade dieser Typ hydrolytischer Enzyme in Pflanzen verbreitet. Als Beispiel sei hier nur auf Papain, Ficin oder Bromelin (WALSH, 1981) hingewiesen. Eine völlige Klärung dieses Katalysemechanismus kann jedoch erst durch proteinchemische Untersuchungen erzielt werden. Bezüglich der Substratspezifität unterscheidet sich die PNA-Esterase jedoch erheblich von den oben genannten Enzymen. Während die meisten Esterasen (KIRSCH, 1971) eine breite Variation von Substraten akzeptieren, werden von der PNA-Esterase nur Verbindungen umgesetzt, die zu den Produkten Vellosimin und 16-epi-Vellosimin führen. Ein weiterer überraschender Befund ist die Tatsache, daß dieses Enzym die beiden Stereoisomere Akuammidinaldehyd und Polyneuridinaldehyd spaltet, obwohl ja gerade die Stereospezifität ein charakteristisches Merkmal enzymatischer Katalyse ist. Eine Erklärungsmöglichkeit für dieses Phänomen wäre, daß in erster Linie die Region um C-22, C-16 und C-17 für die Substratbindung wesentlich ist und die Geschwindigkeit der Reaktion durch die nachfolgende spontane Decarboxylierung bestimmt wird. Andererseits ist das beschriebene katalytische Verhalten der PNA-Esterase äußerst wichtig für die Biosynthese von Alkaloiden des Ajmalin/Sarpagin-Typs. Da sowohl Polyneuridinaldehyd als auch Akuammidinaldehyd von diesem Enzym hydrolysiert werden, hätte das Verhältnis dieser beiden Aldehyde in der Zelle einen erheblichen Einfluß auf die gebildete Menge an Vellosimin und 16-epi-Vellosimin. Diese Verbindungen sind aber jeweils die Vorstufen für die enzymatische Synthese von Sarpagin bzw. Ajmalin, so daß damit auch das Verhältnis dieser beiden Alkaloidgruppen zueinander bestimmt wird. Hierbei kann auch die spontane Epimerisierung von 16-epi-Vellosimin zu Vellosimin eine große Rolle spielen.

In der untersuchten Zellkultur scheint jedoch die Synthese von 16-epi-Vellosimin und damit der Umsatz von Polyneuridin-aldehyd bevorzugt zu erfolgen, da Alkaloide des Ajmalin-Typs bei weitem die Hauptmenge der isolierten Indolalkaloide bilden. Auch die taxonomische Verbreitung der PNA-Esterase unterstreicht die zentrale Bedeutung dieses Enzyms für die Biosynthese von Alkaloiden mit dem Grundskelett des Sarpagins und des Ajmalins. Nur in Pflanzenarten, die Alkaloide dieser Gruppe enthalten, war die PNA-Esterase nachzuweisen.

Vellosimin wird von einem weiteren Enzym in der Biosynthese des Sarpagins umgesetzt, der Vellosimin-Reduktase. Dieses neue Enzym wurde aus Zellkulturen von R. serpentina angereichert und charakterisiert (PFITZNER und STÖCKIGT, 1983d, PFITZNER et al., 1984). Obwohl die Substrate der Vellosimin-Reduktase bedeutend komplexer sind als die der Alkohol-Dehydrogenasen, ergaben sich bei den Untersuchungen zum Mechanismus wichtige Parallelen. Genauso wie bei der ebenfalls NADPH-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase aus Leuconostoc mesenteroides führen Komplektierungsreagenzien zu einer teilweisen Hemmung der Enzymreaktion, die jedoch durch Zugabe der entfernten divalenten Kationen nicht beseitigt werden kann (SCHNEIDER-BERNLÖHR et al., 1981). Außerdem sind für die Aktivität beider Enzyme reduzierende SH-Reagenzien notwendig. Man könnte diesen Befund als Indiz dafür nehmen, daß bei den betrachteten Enzymen Ähnlichkeiten in der Substratbindung und im Reaktionsmechanismus bestehen.

Wie schon unter III. angedeutet, bilden Sarpagin-Typ Alkaloide mit einer Hydroxylgruppe an C-16 die zahlenmäßig bedeutendste Gruppe unter den Verbindungen des Ajmalin/Sarpagin-Typs und zeigen auch die weiteste taxonomische Verbreitung (KOSKINEN und LOUNASMAA, 1983). Es war deshalb von großem Interesse zu prüfen, welcher Strukturtyp als bestes Substrat der Vellosimin-Reduktase fungiert. Die hierfür eingesetzten Alkaloide lassen sich im wesentlichen in zwei Gruppen einteilen, wobei die erste Gruppe an C-16 über eine Carboxymethylgruppe verfügt. Bei der zweiten Gruppe fehlt diese Esterfunk-

tion an C-16. Von beiden Typen wurden Vertreter mit endo- und exo-ständiger Aldehydgruppe auf ihre Bedeutung als Substrate dieser Reduktase getestet. Wie die in Tabelle 9 aufgelisteten Umsatzraten zeigen, können Alkaloide der ersten Gruppe nicht als wichtiges Substrat der Vellosimin-Reduktase angesehen werden, da hier Maximalgeschwindigkeiten von höchstens 5% des Wertes für das am besten umgesetzte Substrat erreicht werden. Es ist daher unwahrscheinlich, daß dieses Enzym eine Rolle bei der Biosynthese von Alkaloiden wie Akuammidin oder Polyneuridin spielt. Die Substrate der zweiten Gruppe werden bedeutend besser umgesetzt, aber auch hier zeigen sich signifikante Unterschiede. Für Substanzen mit endo-ständiger Aldehydgruppe an C-16 wurden deutlich größere K_m -Werte gemessen als für die entsprechenden C-16 Isomere. Bei etwa gleicher Umsatzgeschwindigkeit ist z.B. die MICHAELIS-Konstante für 16-epi-Vellosimin siebenmal größer als für Vellosimin. Dieser Befund gibt einen wichtigen Hinweis auf die biosynthetische Bedeutung der Vellosimin-Reduktase, da 16-epi-Vellosimin die Vorstufe für Alkaloide des Ajmalin-Typs bildet. Man muß also davon ausgehen, daß 16(R)-Aldehyde wie Vellosimin von der Vellosimin-Reduktase in den jeweiligen Alkohol überführt werden, während die Vinorin-Synthese die entsprechenden 16(S)-Verbindungen zu Indoleninen zyklisiert. Dies ist umso wahrscheinlicher, da der K_m -Wert dieser Enzyme für ihr Substrat etwa gleich groß ist (Vellosimin-Reduktase: K_m -Wert für Vellosimin = $16.7 \mu\text{M}$, Vinorin-Synthase: K_m -Wert für 16-epi-Vellosimin = $19.4 \mu\text{M}$). Hinzu kommt, daß Sarpagintyp Alkaloide mit einer endo-ständigen Alkoholgruppe an C-16 und mit fehlender Carboxymethylfunktion bisher nur in zwei Pflanzenarten nachgewiesen wurden (JANOT und LE MEN, 1956, SAKAI et al., 1973), wobei eine zur Familie der Apocynaceae gehört. Derivatisierungen der Substrate an N_a oder am aromatischen Ringsystem haben kaum einen Einfluß auf die Umsatzrate der Vellosimin-Reduktase, so daß dieser Teil des Sarpaginskeletts wohl nur eine geringe Rolle bei der Substratbindung spielt. Interessant ist in diesem Zusammenhang die enzymatische Reduktion von Geissoschizal, einem Alkaloid, das dem Vellosimin strukturell sehr ähnlich ist. Der gravierende Un-

terschied zwischen beiden Verbindungen besteht darin, daß im Geissoschizal die C-5, C-16 Bindung noch nicht geschlossen und dementsprechend die Aldehydgruppe frei beweglich ist. Es zeigt sich, daß weniger der Ringschluß selber als vielmehr die räumliche Anordnung der funktionellen Gruppe die Umsatzgeschwindigkeit bestimmt. Allerdings ist auch hier eine erheblich geringere Affinität der Reduktase zum Substrat festzustellen als bei Alkaloiden mit fixierter exo-ständiger Aldehydgruppe. Von allen getesteten Substanzen wird Vellosimin mit der höchsten Maximalgeschwindigkeit umgesetzt und ist aufgrund des kleinen K_m -Wertes als natürliches Substrat für diese Enzymreaktion anzusehen. Wie schon für die PNA-Esterase beschrieben, beschränkt sich auch die taxonomische Verbreitung der Vellosimin-Reduktase auf Pflanzenarten, die reduzierte Alkaloide der Sarpagin-Gruppe enthalten.

Obwohl eine große Zahl von Alkaloiden der Sarpagin-Klasse durch dieses Enzym umgesetzt wird, ist die Vellosimin-Reduktase ausgesprochen spezifisch in Bezug auf das Cosubstrat. Nur mit dem Cofaktor NADPH konnte eine enzymatische Aktivität gemessen werden. In dieser Beziehung ergeben sich große Ähnlichkeiten zu der Geissoschizin-Dehydrogenase. Während die Vellosimin-Reduktase bei sättigenden Cofaktorkonzentrationen eine normale MENTEN-Kinetik für das Substrat Vellosimin aufweist, zeigt sich für die NADPH-Bindung eindeutig eine positive Kooperativität. Ob es sich bei dieser Reduktase tatsächlich um ein allosterisches Enzym mit zwei Bindungsstellen für NADPH an verschiedenen Untereinheiten nach den Modellen von KOSHLAND und NEET (1968) oder MONOD et al. (1965) handelt, oder ob die Bindung des Cofaktors nur zu einer Aktivierung des Enzyms durch Konformationumlagerung führt (AINSLIE et al., 1972), kann auf diesem Reinheitsstadium nicht entschieden werden. Auf jeden Fall dürfte diese Aktivierung des Enzyms durch NADPH eine sehr effektive Regulationsmöglichkeit sein. Sie bewirkt, daß die Reduktion von Vellosimin praktisch irreversibel abläuft. $NADP^+$ zeigt eine typische Produkthemmung, wie sie von WRATTEN und CLELAND (1963) für die Alkohol-Dehydrogenase beschrieben ist. Während bezüglich

des Substrates Vellosimin eine nichtkompetitive Hemmung festzustellen ist, zeigt sich bei einer NADPH-Abhängigkeit nur eine Verschiebung der Sättigungskurve zu höheren Substratkonzentrationen, so daß hier ein kompetitiver Effekt vorliegt. In Analogie zu den Experimenten zum Mechanismus der Alkohol-Dehydrogenase deutet dieses Inhibierungsmuster darauf hin, daß zuerst NADPH an das Enzymmolekül gebunden wird, bevor sich das Substrat Vellosimin anlagern kann. Die Hemmung der Vellosimin-Reduktase durch NADP^+ hat jedoch keinen Einfluß auf den Kooperativitätsgrad der NADPH-Bindung. In wieweit die NADP^+ -Konzentration trotzdem eine regulatorische Bedeutung für die Biosynthesesequenz zum Sarpagin hat, muß Spekulationen überlassen bleiben. Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß eine regulatorische Funktion der Produkthemmung bei kooperativen Systemen diskutiert wird (FROMM, 1975).

Auch die Fütterungsexperimente von 10-Deoxysarpagin an R. serpentina Zellkulturen demonstrieren eindrucksvoll, wie stark die Bildung des Endproduktes Sarpagin in diesem Biosyntheseweg bevorzugt ist. Bis zu 86% der aufgenommenen Vorstufe wurden in Sarpagin eingebaut, wogegen auch in vivo keine Rückreaktion zum Vellosimin festzustellen war. Andere Metaboliten konnten nicht nachgewiesen werden. Ob diese Hydroxylierung an C-10 ausschließlich auf der Stufe des Deoxysarpagins erfolgen kann, ist mit in vivo Experimenten nicht zu entscheiden. Auch die Substratspezifität der Vellosimin-Reduktase erlaubt zu diesem Problem keine Aussage, da Modifizierungen am Indolteil des Sarpaginskelettes die Umsatzrate nur unwesentlich beeinträchtigen. Für diese Hydroxylierungsreaktion konnte kein in vitro System etabliert werden. Hydroxylierungsreaktionen werden jedoch oft von membrangebundenen Monooxygenasen katalysiert, die sich nur unter großen Schwierigkeiten solubilisieren lassen. Hinzu kommt, daß manche dieser Enzyme, z.B. die Tryptophan-Hydroxylase (KUHN et al., 1979), leicht durch Sauerstoff inaktiviert werden und schon während des Aufschlusses große Aktivitätsverluste auftreten. Eine ähnliche Instabilität könnte auch die erfolglosen Versuche zur Isolierung der genannten Enzymaktivität erklären.

Während Vellosimin in R. serpentina zu Sarpagin umgesetzt wird, ist 16-epi-Vellosimin die Eingangsverbindung für die Biosynthese des Ajmalins. Der Ringschluß dieser Verbindung zu Vinorin bei gleichzeitiger Acetylierung der Hydroxylgruppe an C-17 wird von dem Enzym Vinorin-Synthase katalysiert (PFITZNER und STÖCKIGT, 1983a). SABRI und COURT (1978) und KOSKINEN und LOUNASMAA (1982) forderten für diesen Ringschluß das Enzymprodukt Deacetylvinorin, das dann als Vorstufe für einen enzymatischen Umsatz zu Indoleninen wie Vinorin dienen oder durch Reduktion in Nortetraphyllicin überführt werden sollte. COURT und Mitarbeiter (SABRI und COURT, 1978) berichteten sogar über eine Isolation von 12-Methoxydeacetylvinorin aus R. vomitoria. Ein entsprechendes Produkt konnte bei der untersuchten Enzymreaktion jedoch nicht abgefangen werden. Die Vinorin-Synthase zeigt vielmehr ein kinetisches Verhalten, wie es für Enzyme typisch ist, die erst beide Substrate binden müssen, bevor eine Reaktion stattfinden kann. Auch die Temperaturabhängigkeit der Vinorinbildung ergab keine Anzeichen für die Beteiligung zweier Enzyme an dieser Reaktion. Es muß wohl davon ausgegangen werden, daß Deacetylvinorin bei diesem Ringschluß nur als enzymgebundenes Intermediat auftritt und keine biosynthetische Bedeutung als Substrat für andere Enzymreaktionen hat. Unterstützt wird dieser Befund auch durch die Fütterungsexperimente von [³H-Acetyl]-Vinorin an R. serpentina Zellkulturen. Sowohl in Vomilenin als auch in 17-O-Acetyljmalin und 17-O-Acetylnorajmalin wurde diese Vorstufe unter Erhaltung der radioaktiven Markierung eingebaut. Eine Deacetylzwischenstufe ist also für die Biosynthese dieser Verbindungen nicht essentiell. Zusätzlich weist dieses Einbauexperiment darauf hin, daß Vinorin eine Vorstufe für alle Alkaloide der Ajmalin-Gruppe in R. serpentina ist. Somit kommt der Vinorin-Synthase eine wesentliche Bedeutung in der enzymatischen Synthese dieser Alkaloidgruppe zu.

Alkaloide des Ajmalin-Typs treten als Inhaltsstoffe nur in Pflanzen der Unterfamilie Plumeroideae aus der Familie der Apocynaceae auf und lassen sich in zwei Hauptgruppen gliedern.

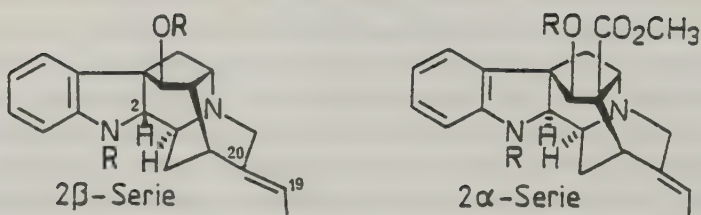


Abb. 67: Grundstruktur von Ajmalin-Typ Alkaloiden der 2α -Serie und der 2β -Serie

1. Die 2β -Serie verfügt über einen β -ständigen Wasserstoff an C-2 und eine freie oder veresterte Hydroxylgruppe an C-17. Alkaloide dieses Typs, dessen wichtigster Vertreter das Ajmalin selber ist, sind hauptsächlich im Tribus Rauwolfieae zu finden.
2. Die 2α -Serie besitzt einen α -ständigen Wasserstoff an C-2 und zusätzlich zu Substituenten an C-17 eine Carboxymethylgruppe an C-16. Alkaloide mit dieser Struktur, z.B. Quebrachidin, sind besonders im Tribus Alstonieae verbreitet.

Eine Überprüfung der Substratspezifität der Vinorin-Synthase sollte nun zeigen, ob dieses Enzym an der Biosynthese beider Strukturtypen beteiligt ist. Wie aus Tabelle 13 zu entnehmen ist, werden Verbindungen mit einer Carboxymethylgruppe an C-16 nicht umgesetzt, während eine Derivatisierung am Indolteil (Gardneral) die Umsatzrate kaum beeinflusst. Zusätzliche Ergebnisse zu dieser Fragestellung lieferte der zellfreie Umsatz von Vomilenin mit der löslichen Proteinfraction aus R. serpentina Zellkulturen in Gegenwart von NADPH und S-Adenosylmethionin (STÖCKIGT et al., 1983). Die massenspektroskopische Analyse des gebildeten Ajmalins zeigt, daß die Übertragung des Wasserstoffes auf C-2 ausschließlich in die β -Position erfolgt.

Sowohl die Vinorin-Synthase-Reaktion als auch die Reduktion an Δ_1 des entstandenen Indolenins führt also ausschließlich zu Alkaloiden der 2 β -Serie. Man muß folglich davon ausgehen, daß Pflanzen, die zur Synthese von Alkaloiden wie Quebrachidin befähigt sind (z.B. Arten der Gattungen Alstonia oder vinca), über einen eigenen Biosyntheseweg für diese Alkaloidstrukturen verfügen. Dieser muß auf der Stufe des Polyneuridinaldehyds von der Ajmalinbiosynthese abzweigen.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis der Substratspezifität der Vinorin-Synthase ist der Befund, daß Verbindungen, die an N_a methyliert sind, im Gegensatz zu den chemischen Experimenten von BARTLETT et al. (1963) nicht zu den entsprechenden Alkaloiden des Ajmalin-Typs zyklisiert werden. Die Methylierungsreaktion kann demnach erst nach einer Reduktion der Indolenindoppelbindung als einer der letzten Schritte in der Biosynthesesequenz zum Ajmalin hin erfolgen. Diese Tatsache ist bemerkenswert, da bei der Bildung zahlreicher Pflanzeninhaltsstoffe, wie für Nicotin (MITZUSAKI et al., 1972) oder die Acridonalkaloide aus Ruta graveolens (BAUMERT et al., 1983) beschrieben, ein Methylierungsschritt in einem sehr frühen Stadium der enzymatischen Synthese erfolgt. Durch Inkubation von Vomilenin mit Rohextrakt aus R. serpentina in Gegenwart von NADPH ließ sich das Enzymprodukt Norajmalin akkumulieren. An dieser Reaktion sind offensichtlich eine Acetylajmalan-Esterase-Aktivität sowie zwei Reduktionsschritte beteiligt. Die Reduktion beider Doppelbindungen erfolgt stereospezifisch und ausschließlich NADPH-abhängig. Ob in dieser Reaktionssequenz zuerst eine Abspaltung der Acetylgruppe an C-17 und dann die Hydridübertragungsschritte erfolgen oder umgekehrt, kann mit den beschriebenen Experimenten nicht geklärt werden. Andererseits bedeutet aber der Einbau von [3H -Acetyl]Vinorin in Alkaloide wie 17-O-Acetylnorajmalin, daß zumindest eine Reduktion an der Δ_1 - und der Δ_{19} -Position unter Erhaltung der Acetylgruppe möglich ist. Mit der oben erwähnten Proteinfraktion aus R. serpentina konnte dann eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf das zellfrei gebildete Norajmalin übertragen werden. Damit ist dieser Methylier-

rungsschritt die letzte enzymatische Reaktion bei der Biosynthese von Ajmalin in R. serpentina Zellkulturen. BARTON et al. (1965) fanden dagegen bei Fütterungsexperimenten an R. verticillata Einbau von 21-Deoxyajmalin in das Ajmalinmolekül (Inkorporationsrate 0.048%). Dieses Experiment würde dafür sprechen, daß die Hydroxylierung an C-21 als letzter Schritt in der Biosynthese des Ajmalins erfolgt. Die hohe Bildungsrate von Vomilenin in R. serpentina Suspensionskulturen macht jedoch deutlich, daß diese Hydroxylierung durchaus in einem früheren Stadium des Biosyntheseweges erfolgen kann, wenn nicht sogar bevorzugt erfolgt. Außerdem sind in dieser Gewebekultur, wie die in vitro Experimente gezeigt haben, alle Enzyme für die Bildung von Ajmalin aus Vomilenin vorhanden. Eine vollständige Klärung dieses Problems kann vermutlich erst durch eine Untersuchung der Substratspezifität dieser Hydroxylase und der Norajmalin-Methyltransferase erreicht werden.

In Abbildung 68 sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Biogenese von Alkaloiden des Ajmalin/Sarpagin-Typs in R. serpentina in Form eines Biosyntheseschemas dargestellt. Alle Schritte dieser Biosynthesesequenz, die zu so komplexen Strukturen wie Ajmalin, einer Verbindung mit 6 Ringen und 9 chiralen Zentren, führt, wurden experimentell überprüft und bis auf die Zyklisierungsreaktion zum Sarpagingrundgerüst im wesentlichen geklärt. Durch Fütterung von [³H-Aryl] Geissoschizin konnte zwar demonstriert werden, daß diese Reaktion auf der Stufe der E-seco-Indolalkaloide erfolgt und kein 5-Carboxyintermediat, wie von COURT (IWU und COURT, 1977) gefordert, für diesen Ringschluß erforderlich ist, aber in vitro Versuche zur Isolation eines Zyklisierungsproduktes blieben bislang erfolglos. Dagegen konnten die drei zentralen Enzyme dieses Biosyntheseweges, FNA-Esterase, Vellosoimin-Reduktase und Vinorin-Synthase angereichert und charakterisiert sowie ihre essentielle Bedeutung für die betrachtete Biosyntheseroute durch die taxonomische Verbreitung und das Induktionsmuster dieser Enzymaktivitäten während des Wachstums einer Suspensionskultur von R. serpentina belegt werden.

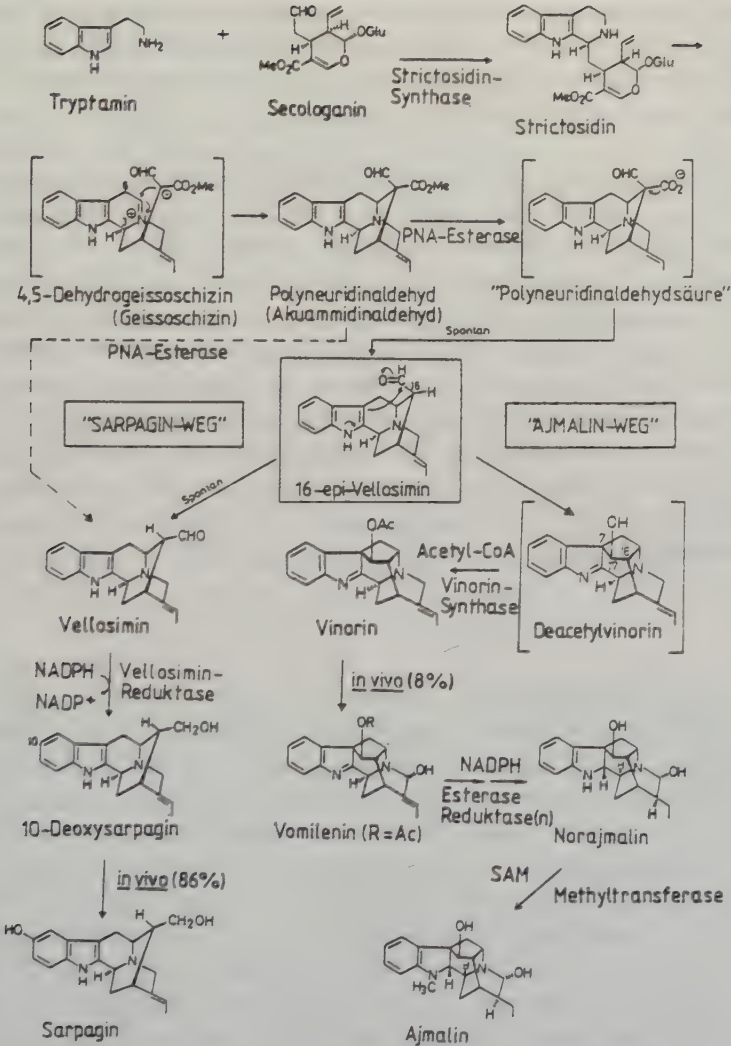


Abb. 68: Biosynthese von Alkaloiden des Ajmalin/Sarpagin-Typs, belegt durch in vivo und in vitro Experimente an R. serpentina Zellkulturen

Besonders durch Überprüfung der Substratspezifität dieser Enzyme ist nunmehr eine so detaillierte Beschreibung der enzymatischen Synthese der untersuchten Alkaloidgruppe möglich, wie es bei sekundären Pflanzenstoffen bisher nur für Flavanoide (HAHLBROCK, 1977) und Heteroyohimbin-Typ Alkaloide (ZENK, 1980) erreicht werden konnte.

Wie die Untersuchungen zur Aminosäurebiosynthese in Escherichia coli gezeigt haben (UMBARGER, 1978), sind solche komplexen Biosyntheseketten oft einer strikten Regulation auf enzymatischer Ebene durch Biosyntheseendprodukte unterworfen. Aus diesem Grunde wurde der Einfluß von Sarpagin und Ajmalin auf die Enzyme PNA-Esterase, Vellosimin-Reduktase und Vinorin-Synthase untersucht. Es konnten jedoch keine Veränderungen in den kinetischen Daten dieser Enzyme festgestellt werden. Wenn eine Regulation innerhalb dieser Biosynthesesequenz stattfindet, erfolgt sie also wahrscheinlich auf der Ebene der Produkte der PNA-Esterase oder durch den Einfluß der Cofaktorkonzentration auf die Vellosimin-Reduktase-Aktivität.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Klärung der Rolle des Geissoschizins in der Biosynthesesequenz der Heteroyohimbin-Typ Alkaloide. Ausgehend von der Stufe des Geissoschizins sollte dann durch in vivo und in vitro Experimente mit einer Suspensionskultur von Rauwolfia seroentina der Biosyntheseweg zu Alkaloiden der Ajmalin/Sarpagin-Gruppe untersucht werden.

Durch Reduktion mit NaB^3H_4 wurde aus enzymatisch synthetisiertem $[5-^{14}\text{C}]4,21\text{-Dehydrogeissoschizin}$ stereoselektiv $[5-^{14}\text{C}, 21\alpha-^3\text{H}]\text{Geissoschizin}$ hergestellt. Einbau dieser Verbindung in Ajmalicin durch Fütterung an Keimlinge von Catharanthus roseus oder durch Inkubation mit einem Proteinrohextrakt aus einer Suspensionskultur derselben Pflanze führte zu einem Ausbau der Tritiummarkierung. Damit konnte im Gegensatz zu den Vorstellungen von LEE et al. (1979) bewiesen werden, daß Geissoschizin nur über das Intermediat 4,21-Dehydrogeissoschizin in Alkaloide dieses Typs eingebaut wird.

Das Enzym, welches die Dehydrierung von Geissoschizin zu 4,21-Dehydrogeissoschizin katalysiert, wurde Geissoschizin-Dehydrogenase (EC 1.5.1.-) genannt. Es wurde aus C. roseus Suspensionskulturen 35fach angereichert und charakterisiert. Durch Gelfiltration wurde ein Molekulargewicht von $65\ 000 \pm 10\%$ bestimmt, das pH-Optimum der Dehydrogenase-Reaktion liegt bei pH 7.6. Für die Substrate NADP^+ und Geissoschizin zeigt dieses Enzym eine normale MENTEN-Kinetik, die K_m -Werte betragen $83\ \mu\text{M}$ für Geissoschizin und $77\ \text{nM}$ für NADP^+ . Die Geissoschizin-Dehydrogenase ist absolut spezifisch für den Cofaktor NADP^+ . Von allen eingesetzten Alkaloiden wurde nur Geissoschizin an der 21α -Position dehydriert. In Zellkulturen von R. serpentina konnte dieses Enzym ebenfalls nachgewiesen werden und ein Vergleich der katalytischen und physikochemischen Eigenschaften beider Enzymprä-

parationen zeigte eine weitgehende Ähnlichkeit auf. Durch Umsatz von Geissoschizin mit einem Enzymrohextrakt aus R. serpentina Suspensionskulturen wurde das Produkt der Geissoschizin-Dehydrogenase über [21-D]Tetrahydroalstonin sowie als Glycerinaddukt identifiziert.

Um zu überprüfen, ob Zellkulturen von R. serpentina in der Lage sind, Alkaloide des Ajmalin/Sarpagin-Typs zu synthetisieren und sich damit für enzymatische Experimente zur Biosynthese dieser Alkaloide eignen, wurde das Alkaloidmuster einer solchen Kultur bestimmt. 14 Alkaloide wurden identifiziert, wobei 5 dem Ajmalin-Typ, 2 dem Yohimbin-Typ, 4 dem Heteroyohimbin-Typ und 3 dem Sarpagin-Typ angehören. Einer dieser Inhaltsstoffe, 17-O-Acetylnorajmalin, wurde erstmals als Naturprodukt isoliert. Über 90% des Alkaloidgehaltes (56.9 mg/l Medium) wird vom Vomilenin repräsentiert, einem Vertreter der Ajmalin-Gruppe. Damit erwies sich diese Kultur als optimales Untersuchungsobjekt für die beabsichtigten Experimente.

Einbauxperimente mit [³H-Aryl]Geissoschizin zeigten, daß dieses Alkaloid eine Vorstufe für alle Alkaloide in R. serpentina Zellkulturen bildet. Dem Geissoschizin kommt demnach auch eine wichtige Rolle in der Biosynthese des Ajmalins zu. Ein Nachweis dieser Funktion des Geissoschizins konnte in vitro nicht erbracht werden.

Zellfreie Untersuchungen mit dieser Gewebekultur führten zur Entdeckung von 7 neuen Pflanzenenzymen, die an der Biosynthese des Sarpagins sowie des Ajmalins beteiligt sind. Bis auf ein Enzym und zwei Hydroxylierungsschritte, die durch in vivo Untersuchungen abgesichert wurden, ließen sich alle enzymatischen Reaktionen nachweisen, die zur Synthese der genannten Alkaloide führen. Eine nahezu vollständige Beschreibung dieser zwei Biosynthesewege ist nunmehr möglich.

I. PNA-Esterase

Inkubation von Polyneuridinaldehyd mit Rohextrakt aus R. serpentina Zellkulturen führte zur Bildung von Vellosimin. Diese Reaktion wird von einem Enzym katalysiert, das den Namen Polyneuridinaldehyd-Esterase (EC 3.1.1.-) erhielt. Dieses Enzym wurde 65fach angereichert und charakterisiert. Im Gegensatz zu den meisten Esterasen zeigt die PNA-Esterase eine hohe Substratspezifität. Von 12 eingesetzten Estern wurden lediglich die Stereoisomere Polyneuridinaldehyd und Akuammidinaldehyd umgesetzt. Kinetische Untersuchungen zur Vellosiminbildung führten zur Identifizierung des eigentlichen Enzymproduktes, 16-epi-Vellosimin, einer neuen, jedoch instabilen Verbindung, die spontan zu Vellosimin epimerisiert. Diese geringe Stabilität ist der Grund dafür, daß diese Substanz bisher noch nicht beschrieben wurde. Hemmstoffexperimente lassen vermuten, daß es sich bei diesem Enzym um eine SH-Esterase handelt, deren Hydrolyseprodukt durch spontane Decarboxylierung in 16-epi-Vellosimin übergeht. Dementsprechend wurden keine Hinweise auf das Vorliegen der Polyneuridinaldehysäure gefunden.

II. Vellosimin-Reduktase

Vellosimin ist das Substrat für das Folgeenzym in der Biosynthesesequenz zum Sarpagin. Dieses Enzym, Vellosimin-Reduktase (EC 1.1.1.-), katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von Vellosimin zu 10-Deoxysarpagin. Mit einer 110fach angereicherten Enzympräparation wurde die Charakterisierung der Vellosimin-Reduktase durchgeführt. Während sich für das Substrat Vellosimin ($K_m = 16.7 \mu M$) eine typische Sättigungskurve nach MICHAELIS und MENTEN ergab, zeigte dieses Enzym bezüglich der Bindung des Cofaktors NADPH ($K_m = 22 \mu M$) eine positive Kooperativität, für die sich ein HILL-Koeffizient von 1.95 errechnet. Für die katalytische Aktivität der Vellosimin-Reduktase sind wahrscheinlich divalente Metallionen notwendig. Im Gegensatz zu der PNA-Esterase zeigt diese Reduktase eine relativ breite Substratspezifität. 10 Indolalkaloide mit einer Aldehydgruppe an C-16 konnten enzymatisch umgesetzt werden. Die größte Reaktionsgeschwindigkeit wurde jedoch mit

Vellosimin erzielt. Da Vellosimin von allen getesteten Alkaloiden des Sarpagin-Typs am besten von der Vellosimin-Reduktase umgesetzt wurde, lag die Vermutung nahe, daß das Enzymprodukt lo-Deoxysarpagin eine wichtige Vorstufe des Sarpagins ist, dem Endprodukt dieser Biosynthesekette. Einbauexperimente mit radioaktiv markiertem lo-Deoxysarpagin führten zu einer ungewöhnlich hohen Inkorporationsrate von 85.6% in das Alkaloid Sarpagin. Damit wurde lo-Deoxysarpagin als direkte Vorstufe für diese Verbindung identifiziert.

III. Vinorin-Synthase

16-epi-Vellosimin, das Produkt der PNA-Esterase, ist nicht nur eine Vorstufe für alle Alkaloide der Sarpagin-Gruppe, sondern auch für die Alkaloide des Ajmalin-Typs. Als Eingangsreaktion zu Alkaloiden mit dem Grundskelett des Ajmalins wurde durch in vitro Experimente die Acetyl-CoA-abhängige Zyklisierung von 16-epi-Vellosimin zu Vinorin (21-Deoxyvomilenin) nachgewiesen. Das Enzym, welches diese Reaktion katalysiert, erhielt die Bezeichnung Vinorin-Synthase (EC 4.1.2.-) und wurde aus R. serpentina Zellkulturen 160fach angereichert. Für die beiden Substrate 16-epi-Vellosimin ($K_m = 19.4 \mu M$) und Acetyl-CoA ($K_m = 64 \mu M$) zeigte dieses Enzym eine normale MENTEN-Kinetik. Im Gegensatz zu den bisherigen Vorstellungen, nach denen Deacetylvinorin ein Zwischenprodukt für alle Alkaloide mit Ajmalin-Grundgerüst ist (KOSKINEN und LOUNASMAA, 1982), tritt eine solche Verbindung bei der Vinorin-Synthase-Reaktion nicht frei auf. Somit kommt dem Deacetylvinorin nicht die erwartete biosynthetische Bedeutung zu. Von 6 eingesetzten Sarpagin-Typ Alkaloiden wurden nur 16-epi-Vellosimin und 11-Methoxy, 16-epi-Vellosimin (Gardner) zu Alkaloiden mit Ajmalin-Skelett umgesetzt. Die entsprechenden N_a-methylierten Verbindungen zeigten keine Zyklisierungsreaktion. Dieser Methylierungsschritt muß also zu einem späteren Zeitpunkt in der Biogenese des Ajmalins erfolgen. Da Vinorin sich nur durch eine Hydroxylgruppe an C-21 von Vomilenin, dem Hauptalkaloid in dieser Suspensionskultur, unterscheidet, schien es wahrscheinlich, daß Vinorin eine Vorstufe für diese Verbindung

darstellt. In vitro Versuche zur Hydroxylierung an C-21 blieben zwar erfolglos, aber Fütterungsexperimente mit [^3H -Acetyl]Vinorin führten zu einem signifikanten Einbau in die Alkaloide Vomilenin, 17-O-Acetylnorajmalin und 17-O-Acetyljmalin. Diese Experimente beweisen, daß Vinorin eine direkte Vorstufe für andere Alkaloide des Ajmalin-Typs darstellt. Die Vinorin-Synthase nimmt somit eine Schlüsselposition in der Biosynthese dieser Alkaloide ein.

IV. Acetyljmalan-Esterase, Indolenin-Reduktase(n), Norajmalin-Methyltransferase

Das Alkaloid Vomilenin wurde mit einem Enzymsystem aus R. serpentina zu Ajmalin umgesetzt. An dieser Reaktion sind eine Acetyljmalan-Esterase, zwei enzymatische Reduktionsschritte an C_1 und C_{19} sowie eine S-Adenosylmethionin-abhängige Norajmalin-Methyltransferase beteiligt. Beide Reduktionsreaktionen erfolgen ausschließlich mit dem Cosubstrat NADPH. Bei der Verwendung von NADPD wurden zwei Deuteriumatome in das Ajmalin-Molekül eingebaut, wobei eines massenspektroskopisch an C-2 lokalisiert werden konnte. Gleichzeitig zeigte die massenspektroskopische Analyse des Reaktionsproduktes, daß die Reduktion der Indolenin-Doppelbindung stereospezifisch erfolgt. Als letzter Schritt in der Biosynthese des Ajmalins wurde die N_a -Methylierung von Norajmalin nachgewiesen. Damit bestätigten sich die Befunde zur Substratspezifität der Vinorin-Synthase.

Neben der Substratspezifität ist auch die Induktionszeit eines Enzyms während des Wachstums einer Zellkultur ein Kriterium dafür, ob dieses Enzym an der Biosynthese eines Inhaltsstoffes beteiligt ist. Deshalb wurde das Wachstum einer Suspensionskultur von R. serpentina über 40 Tage verfolgt und der Gehalt an Ajmalin und Vomilenin sowie die Aktivität von Strictosidin-Synthase, Vellosimin-Reduktase, PNA-Esterase, Acetyljmalan-Esterase und Norajmalin-Methyltransferase bestimmt. Sämtliche getesteten Enzymaktivitäten erreichen fast gleichzeitig ein Maximum nach 10-13 Tagen. Dagegen

nimmt der Vomileningehalt bis zum 17. Wachstumstag zu. Dieses Induktionsmuster zeigt, daß alle isolierten Enzyme zu einem Biosyntheseweg gehören und für die Bildung von Alkaloiden der Ajmalin-Gruppe verantwortlich sind.

Bei den charakterisierten Enzymen aus der beschriebenen Biosynthesesequenz handelt es sich um lösliche Proteine, die durch ihr kleines Molekulargewicht (30 500-42 000) und ihren sauren isoelektrischen Punkt (pH 4.4-5) auffallen. Außerdem zeigen sie eine ausgesprochene Substratspezifität und kommen in den verschiedensten Pflanzen und Gewebekulturen vor, die die entsprechenden Strukturtypen auch synthetisieren. Dieser Befund weist zusätzlich darauf hin, daß dem Biosyntheseschema, das in dieser Arbeit für Alkaloide der Ajmalin/Sarpagin-Gruppe aufgestellt wurde, eine allgemeine Bedeutung zukommt.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- AHLERS, J.: Enzymkinetik. G. Fischer Verl. Stuttgart, New York 1982
- AINSLIE, G.R., SHILL, I.P., NEET, K.E.: Transients and Cooperativity. Slow Transition Model for Relating Transients and Cooperative Kinetics of Enzymes. J. Biol. Chem. 247 (1972) 7088-7096.
- AKINLOYE, B.A., COURT, W.E.: The Alkaloids of Rauwolfia volkensii. J. Ethnopharmacol. 4 (1981) 99-109.
- ANDREWS, P.: Estimation of the Molecular Weight of Proteins by Sephadex Gelfiltration. Biochem. J. 91 (1964) 222-233.
- ANDREWS, P.: The Gel-Filtration Behaviour of Proteins Related to their Molecular Weight over a Wide Range. Biochem.J. 96 (1965) 595-606
- ANET, F.A.L., CHAKRAVARTI, D., ROBINSON, R., SCHLITTLER, E.: Ajmaline Part I. J. Chem. Soc. (1954) 1242-1260.
- ANTONACCIO, C.D., PEREIRA, N.A., GILBERT, B., VORBRUEGGEN, H., BUDZIKIEWICZ, H., WILSON, J.M., DURHAM, L.J., DJERASSI, C.: Alkaloid Studies XXXIII. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems VI. Polyneuridine, A New Alkaloid from Aspidosperma polyneuron and Some Observations on Mass Spectra of Indole Alkaloids. J. Am. Chem. Soc. 84 (1962) 2161-2169.
- ARENS, H.: Züchtung von Catharanthus roseus Pflanzen mit hohem Serpentin- und Raubasingehalt. In: Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods. Proceedings of an International Symposium on Plant Cell Culture. Alfermann, A.W., Reinhard, E. (eds.) München 1978
- ARENS, H.: Radioimmuntests für die Bestimmung von Indolalkaloiden. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum 1979
- BARTLETT, M.F., SKLAR, R., TAYLOR, W.I., SCHLITTLER, E., AMAI, R.L.S., BEAK, P., BRINGI, N.V., WENKERT, E.: Rauwolfia Alkaloids XXXVIII. Stereospecific Degradation Leading to the Absolute Configuration and Structure of Ajmaline, Sarpagine and Corynantheidine. J. Am. Chem. Soc. 84 (1961) 622-630.
- BARTLETT, M.F., LAMBERT, B.F., WERBLOOD, H.M., TAYLOR, W.I.: Rauwolfia Alkaloids XLIII. A Facile Ring Closure of Deoxyajmalal A to Deoxyajmaline. J. Am. Chem. Soc. 85 (1963) 475-477.

- BARTON, D.H.R., KIREY, G.W., PRAGER, R.H., WILSON, E.M.: On the Origin of the C-1 Fragment in the Indole Alkaloids. *J. Chem. Soc.* (1965) 3990-3994.
- BARTON, D.H.R., BHAKNNI, D.S., JAMES, P., KIREY, G.W.: Phenol Oxidation and Biosynthesis Part XII. Stereochemical Studies Related to the Biosynthesis of the Morphine Alkaloids. *J. Chem. Soc.* (1967) 128-132.
- BATTERSBY, A.R., YEOWELL, D.A.: Alkaloids of Calabash-curare and Strychnos Species Part III. Structure and Absolute Stereochemistry of Macusine A, Macusine B and Macusine C. *J. Chem. Soc.* (1964) 4419-4427.
- BATTERSBY, A.R., KAPIL, R.S., MARTIN, I.A., MO, L.: Loganin as a Precursor of the Indole Alkaloids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1968) 133-134.
- BATTERSBY, A.R., HALL, E.S.: The Intermediacy of Geissoschizine in Indole Alkaloid Biosynthesis. Rearrangement to the Strychnos Skeleton. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1969) 793-794.
- BAUMERT, A., HIEKE, M., GRÖGER, D.: N-Methylation of Anthranilic Acid to N-Methylantranilic Acid by Cell-free Extracts of Ruta graveolens Tissue Cultures. *Planta medica* 48 (1983) 258-262.
- BEIN, H.J.: The Pharmacology of Rauwolfia. *Pharmacol. Rev.* 8 (1956) 435-483.
- BIEMANN, K., BOMMER, P., BURLINGAME, A.L., McMURRAY, W.J.: High-Resolution Mass Spectra of Ajmaline and Related Alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 4624-4628.
- BIOSCA, I.A., TRAVERS, F., BARMAN, T.E.: A Jump in an Arrhenius Plot Can be the Consequence of a Phase Transition. The Binding of ATP to Myosin Subfragment I. *FEBS Letters* 153 (1983) 217-220.
- ELAICH, R.: Analytische Elektrophoreseverfahren. G. Thieme Verl. Stuttgart 1978
- BOMBARDELLI, E., BONATI, A., RUSCO, G.: Un nuovo alcaloide della Rauwolfia vomitoria Afz. *Fitoterapia* 38 (1967) 126-128.
- BRADFORD, M.: A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye-Binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- BRÄNDEN, C.-I.: Alcohol-Dehydrogenases. In: The Enzymes Vol. 11. Boyer, P.D. (ed.) Academic Press New York 1975
- BRODELIUS, P.: Synthesis of Three AMP-Analogues and their Application as General Ligands in Biospecific Affinity Chromatography. *Eur. J. Biochem.* 47 (1974) 81-89.

- CHATTERJEE, A., BANDYOPADHYAY, S.: Velloosimine, an Alkaloid of Rauwolfia vomitoria. Ind. J. Chem. 18 (1979) 87-88.
- COREY, E.J., KIM, C.U.: A New and Highly Effective Method for the Oxidation of Primary and Secondary Alcohols to Carbonyl Compounds. J. Am. Chem. Soc. 94 (1972) 7586-7587.
- DAVIS, B.J.: Disk electrophoresis II. Method and Application to Human Serum Proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121 (1964) 404-427.
- DIXON, M., WEBB, E.C.: Enzymes. Longman, Green & Co London 1966
- FRIEDMAN, P.A., KAPPELMAN, A.H., KAUFMAN, S.: Partial Purification and Characterization of Tryptophan-Hydroxylase from Rabbit Hindbrain. J. Biol. Chem. 247 (1972) 4165-4173.
- FROMM, H.J.: Initial Rate Enzyme Kinetics. In: Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics Vol. 22. Kleinzeller, A., Springer, G.F., Wittmann, H.G. (eds.) Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York 1975
- GAMBORG, O.L., MÜLLER, R.A., OJIMA, K.: Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soyabean Root Cells. Exp. Cell Res. 50 (1968) 151-158.
- GASKELL, A.J., JOULE, J.A.: The Acid Catalysed C-3 Epimerisation of Reserpine and Dereserpine. Tetrahedron 23 (1967) 4053-4063.
- GILBERT, H.F., O'LEARY, M.H.: Modification of Arginine and Lysine in Proteins with 2,4-Pentanedione. Biochemistry 14 (1975) 5194-5199.
- GOSSET-GARNIER, I., LE-MEN, I., JANOT, M.-M.: Stereochimie de la vincamedine et de la vincamajine. Bull. Soc. Chim. France 9 (1965) 676-678.
- HAHLEROCK, K.: Regulatory Aspects of Phenylpropanoid Biosynthesis in Cell Cultures. In: Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application. Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (eds.) Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York 1977
- HEINSTEIN, P., STÖCKIGT, J., ZENK, M.H.: Interconversion of the Enamine and Immonium Form of Cathenamine. Tetrahedron Letters 21 (1980) 141-144.
- HESSE, M.: Indolalkaloide. In: Fortschritte der Massenspektroskopie. Budzikiewicz, H. (ed.) Verlag Chemie Weinheim 1974
- HOFMANN, A., FREY, A.J.: Isolierung weiterer Alkaloide aus Rauwolfia vomitoria Afz. Vomalidin, ein neues Alkaloid der Ajmalin-Gruppe. Helv. Chim. Acta 40 (1957) 1866-1874.

- IWU, M.M., COURT, W.E.: Root Alkaloids of Rauwolfia vomitoria Afz.
Planta medica 32 (1977) 88-99.
- IWU, M.M., COURT, W.E.: The Alkaloids of Rauwolfia mombasiana Leaves.
Planta medica 33 (1978) 232-236.
- JANOT, M.-M., LE-MEN, J.: Sur les alcaloides cristallises du Lochnera (Vinca) rosea (L) Reichb. ou Catharanthus roseus G.Don.
C. R. Acad. Sc. Paris, Ser. C 243 (1956) 1789-1792.
- KÄHLER, H.J.: Rauwolfia Alkaloide. Boehringer Mannheim GmbH 1970
- KAN-FAN, C., HUSSON, H.-P.: Isolation and Biomimetic Conversion of 4,21-Dehydrogeissoschizine.
J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1979) 1015-1016 .
- KIANG, A.K., LOH, S.K., DEMANCZYK, M., GEMENDEN, C.W., PAPARIELLO, G.J., TAYLOR, W.I.: The Structure of Peraksine (RP-5) and RP-7 Constituents of the Leaves and Stems of Rauwolfia perakensis.
Tetrahedron 22 (1966) 3293-3300.
- KINDL, H., WÖBER, G.: Biochemie der Pflanzen. Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York 1975
- KIRSCH, K.: Carboxylic Ester Hydrolases. In: The Enzymes Vol. 5. Boyer, P.D. (ed.) Academic Press New York 1971
- KLISCHIES, M.: Untersuchungen zur Biosynthese phenylpropa-noider Naturstoffe. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum 1977
- KOSHLAND, D.E., NEET, K.E.: The Catalytic and Regulatory Properties of Enzymes.
Ann. Rev. Biochem. 37 (1968) 359-410.
- KOSKINEN, A., LOUNASMAA, M.: Biogenesis of the Ajmaline-Type Alkaloids.
Planta medica 45 (1982) 248-249.
- KOSKINEN, A., LOUNASMAA, M.: The Sarpagine-Ajmaline Group of Indole Alkaloids. In: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G.W. (eds.) Springer Verl. Wien, New York 1983
- KUHN, D.M., RUSKIN, B., LOVENEER, W.: Tryptophan-Hydroxylase, the Role of Oxygen, Iron and Sulfhydryl Groups as Determinant of Stability and Catalytic Activity.
J. Biol. Chem. 255 (1979) 4137-4143.
- LEE, S.L., HIRATA, T., SCOTT, A.I.: Indole Alkaloid Biosynthesis in Catharanthus roseus - Involvement of Geissoschizine and 19-epi-Ajmalicine.
Tetrahedron Letters 8 (1979) 691-694.
- LEETE, E.: Biogenesis of the Rauwolfia Alkaloids I. The Incorporation of Tryptophan into Ajmaline.
J. Am. Chem. Soc. 82 (1960) 6338-6342.

- LIBOT, F., KUNESCH, N., POISSON, J.: Structure complete de la Raucaffrinoline et filiation avec la Vomilenine. *Phytochemistry* 19 (1980) 989-991.
- LINEWEAVER, H., BURK, D.: The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56 (1934) 658-666.
- LINSMAIER, E.M., SKOOG, F.: Organic Growth Factors Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 18 (1965) 110-125.
- MAJUMDAR, S.P., POISSON, J., PORTIER, P.: Plants of New Caledonia XXIV. Alkaloids of *Rauwolfia suaveolens*. *Phytochemistry* 12 (1973) 1167-1169.
- MEISEL, H., DÖPKE, W., GRÜNDEMANN, E.: Struktur und Stereochemie des Vinorins. *Tetrahedron Letters* 17 (1971) 1291-1293.
- MICHAELIS, L., MENTEN, M.L.: Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* 49 (1913) 333-369.
- MIZUSAKI, S., TANABE, Y., NOGUCHI, M., TAMAKI, E.: Phytochemical Studies on Tobacco Alkaloids XIV. Occurrence and Properties of Putrescine N-Methyltransferase in Tobacco Roots. *Phytochemistry* 11 (1972) 2757-2762.
- MONOD, J., WYMAN, J., CHANGEUX, J.P.: On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J. Mol. Biol.* 12 (1965) 88-118.
- MUCCINO, R.R., SERICO, L.: Acid Catalyzed Tritium Exchange of Activated Aromatic Protons. *J. Labelled Compounds Radiopharm.* 15 (1978) 529-532.
- MÜLLER, I.M., SCHLITTLER, E., BEIN, H.J.: Reserpin, der sedative Wirkstoff aus *Rauwolfia serpentina* Benth. *Experientia* 8 (1955) 338.
- NAGAKURA, N., RÜFFER, M., ZENK, M.H.: The Biosynthesis of Monoterpenoid Indole Alkaloids from Strictosidine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* (1979) 2308-2312.
- PFITZNER, A.: Untersuchungen zur Enzymregulation der Carboxydismutase. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum 1979
- PFITZNER, A., STÖCKIGT, J.: Partial Purification and Characterization of Geissoschizine-Dehydrogenase from Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* 21 (1982) 1585-1588.
- PFITZNER, A., STÖCKIGT, J.: Biogenetic Link Between Sarpagine and Ajmaline Type Alkaloids. *Tetrahedron Letters* 24 (1983a) 5197-5200.
- PFITZNER, A., STÖCKIGT, J.: Polyneuridine Aldehyde Esterase: An Unusually Specific Enzyme Involved in the Biosynthesis of Sarpagine Type Alkaloids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1983b) 459-460.

- PFITZNER, A., STÖCKIGT, J.: Characterization of Polynneuridine Aldehyde Esterase, a Key Enzyme in the Biosynthesis of Sarpagine/Ajmaline Type Alkaloids.
Planta medica 48 (1983c) 221-227.
- PFITZNER, A., STÖCKIGT, J.: Vellosoimine Reductase, a Specific Enzyme Involved in the Cell-free Biosynthesis of Sarpagine Type Alkaloids.
Tetrahedron Letters 24 (1983d) 1695-1698.
- PFITZNER, A., KRAUSCH, B., STÖCKIGT, J.: Characteristics of Vellosoimine Reductase, a Specific Enzyme Involved in the Biosynthesis of the Rauwolfia Alkaloid Sarpagine.
Tetrahedron (1984), Manuskript eingereicht.
- PFITZNER, U., ZENK, M.H.: Immobilization of Strictosidine Synthase from Catharanthus roseus Cell Cultures and Preparative Synthesis of Strictosidine.
Planta medica 46 (1982) 10-14.
- RAPOPORT, H., WINDGASSEN, R.J., HUGHES, N.A., ONAK, T.P.: Alkaloids of Geissospermum vellosii. Further Studies on Geissospermine and the Structures of the Indolic Cleavage Products, Geissoschizine and Apogeissoschizine.
J. Am. Chem. Soc. 82 (1960) 4404-4414.
- RAPOPORT, H., MOORE, R.E.: Alkaloids of Geissospermum vellosii. Isolation and Structure Determination of Vellosoimine, Vellosoimol and Geissosolimine.
J. Org. Chem. 27 (1962) 2981-2985.
- RAUEN, H.M.: Biochemisches Taschenbuch, Teil I und II.
Springer Verl. Berlin 1964
- ROBINSON, R.: Die Chemie des Ajmalins.
Angew. Chemie 69 (1957) 40-44.
- RÜFFER, M., KAN-FAN, C., HUSSON, H.-P., STÖCKIGT, J., ZENK, M.H.: 4,21-Dehydrogeissoschizine, an Intermediate in Heteroyohimbine Alkaloid Biosynthesis.
J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1979) 1016-1018.
- SABRI, N.N., COURT, W.E.: Stem Alkaloids of Rauwolfia vomitoria.
Phytochemistry 17 (1978) 2023-2026.
- SAINSBURY, M., WEBB, B.: Extractives of Ochrosiinae II. Minor Alkaloids of Bleekeria vitiensis.
Phytochemistry 11 (1972) 2337-2339.
- SAKAI, S.-I., KUBO, A., HAMAMOTO, T., WAKABAYASHI, M., TAKAHASHI, K., OHTANI, H., HAGINIWA, J.: The Structures of Gardnerine, Gardnutine and Hydroxygardnutine and the Absolute Configuration of Gardnerine.
Chem. Pharm. Bull. 21 (1973) 1783-1798.
- SAKAI, S.-I., YAMAMOTO, Y., HASEGAWA, S.: The Chemical Transformation of Gardnerine to 2-Acylindole Alkaloid "Ochropine".
Chem. Pharm. Bull. 28 (1980) 3454-3456.

- SCHLITTLER, E., HUBER, H.V., BADER, F.E., ZAHND, H.: Über das Alkaloid Serpentinin aus Rauwolfia serpentina Benth. Helv. Chim. Acta 37 (1954) 1912-1920.
- SCHNEIDER-BERNLÖHR, H., FIEDLER, H., GERBER, M., WEBER, C., ZEPPEZAUER, M.: Alcohol-Dehydrogenase from Leuconostoc mesenteroides: Molecular Properties in Comparison with the Yeast and Horse Liver Enzyme. Int. J. Biochem. 13 (1981) 1215-1224.
- SCHUMAN, K.: Apocynaceae. In: Die natürlichen Pflanzenfamilien IV Abteilung 2. Engler, A., Prantl, K., Leipzig 1895
- SCOTT, A.I., LEE, S.L.: Biosynthesis of the Indole Alkaloids. A Cell-free System from Catharanthus roseus. J. Am. Chem. Soc. 97 (1975) 6906-6908.
- SEIFEL, U.: Untersuchungen zur Bildung der Strictosidin-Synthase in Catharanthus roseus Zellsuspensionskulturen. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum 1979
- SEN, G., BOSE, K.G.: Rauwolfia serpentina - a New Indian Drug for Insanity and High Blood Pressure. Indian Med. World 2 (1931) 194.
- SHARP, T.M.: The Alkaloids of Alstonia Barks. Part I A. constricta F.Muell J. Chem. Soc. (1934) 287-291.
- SHELLARD, E.J., PHILLIPSON, J.D., GUPTA, D.: The Mitragyne Species of Asia. Part XIII The Alkaloids of the Leaves of Mitragyna parvifolia (Roxb.) Korth. Obtained from India. Planta medica 16 (1968) 436-445.
- SHIMOLINA, L.L., MININA, S.A.: Vomilenine from Rauwolfia serpentina Tissue Cultures. Khim. Priř. Soedin. 6 (1981) 807.
- SIDDIQUI, S., SIDDIQUI, R.H.: Chemical Examination of the Roots of Rauwolfia serpentina Benth. J. Indian Chem. Soc. 8 (1931) 667-680.
- SLUYTERMAN, L.A.AE.: Chromatofocusing: Isoelectric Focusing on Ion-Exchange Columns. I. General Principles. J. Chromatogr. 150 (1978) 17-30.
- STÖCKIGT, J., TREIMER, J., ZENK, M.H.: Synthesis of Ajmalicine and Related Alkaloids by Cell Free Extracts of Catharanthus roseus Cell Suspension Cultures. FEBS Letters 70 (1976) 267-270.
- STÖCKIGT, J., HUSSON, H.-P., KAN-FAN, C., ZENK, M.H.: Cathenamine, a Central Intermediate in the Cell-free Biosynthesis of Ajmalicine and Related Indole Alkaloids. J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1977) 164-166.

- STÖCKIGT, J., KLISCHIES, M.: Biosynthesis of Lignans. Part I
Biosynthesis of Arctiin und Phillyrin.
Holzforschung 31 (1977) 41-44.
- STÖCKIGT, J., ZENK, M.H.: Isovincoside (Strictosidine) the
Key Intermediate in the Enzymatic Formation of Indole
Alkaloids.
FEBS Letters 79 (1977) 233-237.
- STÖCKIGT, J.: Indirect Involvement of Geissoschizine in the
Biosynthesis of Ajmalicine and Related Alkaloids.
J.Chem. Soc. Chem. Commun. (1978) 1097-1099.
- STÖCKIGT, J.: Non-Involvement of 5 α -Carboxystrictosidine and
-Vincoside in the Biosynthesis of Sarpagine- and
Ajmaline-Type Alkaloids.
Tetrahedron Letters 28 (1979) 2615-2618.
- STÖCKIGT, J., HÖFLE, G., PFITZNER A.: Mechanism of the Biosyn-
thetic Conversion of Geissoschizine to 19-epi-Ajmalicine
in Catharanthus roseus.
Tetrahedron Letters 21 (1980) 1925-1926.
- STÖCKIGT, J., PFITZNER, A., FIRL, J.: Indole Alkaloids from
Cell Suspension Cultures of Rauwolfia serpentina Benth.
Plant Cell Rep. 1 (1981) 36-39.
- STÖCKIGT, J., PAWELKA, K.-H., ROTHER, A., DEUS, B.: Indole
Alkaloids from Cell Suspension Cultures of Stemmadenia
tomentosa and Voacanga africana.
Z. Naturforsch. 37c (1982) 857-860.
- STÖCKIGT, J., PFITZNER, A., KELLER, P.J.: Enzymatic Formation
of Ajmaline.
Tetrahedron Letters 24 (1983) 2485-2486.
- STÖCKIGT, J., PAWELKA, K.-H., TANAHASHI, T., DANIELI, B.,
HULL, W.E.: Voafirin A and Voafirin B, New Dimeric Indole
Alkaloids from Cell Suspension Cultures of Voacanga
africana Stapf.
Helv. Chim. Acta (1984), im Druck.
- STOLL, A., HOFMANN, A.: Sarpagin, ein neues Alkaloid aus
Rauwolfia serpentina Benth.
Helv. Chim. Acta 36 (1953) 1143-1147.
- SUND, V., THEORELL, H.: Alcohol-Dehydrogenases.
In: The Enzymes Vol. 7. Boyer, P.D., Lardy, H.,
Myrbäck, K. (eds.) Academic Press New York 1963
- TAYLOR, W.I.: The Ajmaline-Sarpagine Alkaloids. In: The
Alkaloids Vol. 8. Manske, R.H.F. (ed.) Academic Press
New York 1965
- TAYLOR, W.I.: The Ajmaline-Sarpagine Alkaloids. In: The
Alkaloids Vol. 11. Manske, R.H.F. (ed.) Academic Press
New York 1968
- TAYLOR, W.I., FREY, A., HOFMANN, A.: Vomilenin und seine Um-
wandlung in Perakin.
Helv. Chim. Acta 45 (1962) 611-614.

- THOMAS, R.: A Possible Biosynthetic Relationship Between the Cyclopentanoid Monoterpenes and the Indole Alkaloids. *Tetrahedron Letters* 16 (1961) 544-553.
- TREIMER, J., ZENK, M.H.: Enzymic Synthesis of Corynanthe-Type Alkaloids in Cell Cultures of *Catharanthus roseus*: Quantitation by Radioimmunoassay. *Phytochemistry* 17 (1978) 227-231.
- ULBRICH, B., ZENK, M.H.: Partial Purification of Hydroxycinnamoyl-CoA : Quinate Hydroxycinnamoyl Transferase from Higher Plants. *Phytochemistry* 18 (1979) 929-933.
- UMBARGER, H.E.: Aminoacid Biosynthesis and Its Regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 47 (1978) 533-606.
- VAN TAMELEN, E.E., HAARSTADT, V.R., ORVIS, R.L.: Hypohalite-Induced Oxidative Decarboxylation of α -Amino Acids. *Tetrahedron* 24 (1968) 687-704.
- WALSH, C.: Enzymatic Reaction Mechanisms. Freeman & Co San Francisco 1981
- WARBURG, O., CHRISTIAN, W.: Gärungs-Co-Ferment. *Biochem. Z.* 286 (1936) 156-158.
- WARREN, S., ZERNER, B., WESTHEIMER, F.: Acetoacetate Decarboxylase-Identification of Lysine at the Active Site. *Biochemistry* 5 (1968) 817-833.
- WENKERT, E., BRINGI, N.V.: A Stereochemical Interpretation of the Biosynthesis of Indole Alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* 81 (1959) 1474-1481.
- WESTHEIMER, F., JONES, W.A.: The Effect of Solvent on Some Reaction Rates. *J. Am. Chem. Soc.* 63 (1941) 3283-3286.
- WRATTEN, C.C., CLELAND, W.W.: Product Inhibition Studies on Yeast and Liver Alcohol-Dehydrogenase. *Biochemistry* 2 (1963) 935-941.
- WOODWARD, R.B.: Neuere Entwicklungen in der Chemie der Naturstoffe. *Angew. Chemie* 68 (1956) 13-20.
- ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., SCHULTE, U.: Anthraquinone Production by Cell Suspension Cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta medica Suppl.* (1975) 79-101.
- ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., ARENS, H., STÖCKIGT, J., WEILER, E.W., DEUS, B.: Formation of the Indole Alkaloids Serpentine and Ajmalicine in Cell Suspension Cultures of *Catharanthus roseus*. In: Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application, Proceedings in Life Science. Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (eds.) Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York 1977
- ZENK, M.H.: Enzymatic Synthesis of Ajmalicine and Related Indole Alkaloids. *J. Nat. Prod.* 43 (1980) 438-451.

D a n k s a g u n g

Herrn Doz. Dr. J. Stöckigt danke ich für die Anregung zur Bearbeitung dieses Themas. Besonders seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. M.H. Zenk danke ich für die guten Arbeitsmöglichkeiten.

Des weiteren danke ich Herrn Dr. G. Höfle, Braunschweig, Herrn Prof. Dr. J. Firl, Garching, und Dr. P.J. Keller, Ohio, für die Messung von ^1H -NMR-Spektren. Zusätzlich danke ich Herrn Prof. Dr. J. Firl für seine Hilfe bei der Interpretation der Spektren.

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen anderen, die mit Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

L e b e n s l a u f

Am 29. Juni 1954 wurde ich, Artur Pfitzner, als Sohn des Arbeiters Gerhard Pfitzner und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Franken, in Emmerich am Rhein geboren.

Im April 1960 wurde ich in die Liebfrauenschule Speelberg eingeschult und wechselte 1965 zur Städtischen Realschule Emmerich. Nach Erlangung der Mittleren Reife besuchte ich von 1970 bis 1973 das Städtische Neusprachliche Gymnasium in Emmerich und legte dort mein Abitur ab.

Im Wintersemester 1974/75 nahm ich das Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum auf, das ich im September 1979 mit der Diplom-Hauptprüfung abschloß. Im Oktober 1979 begann ich unter Anleitung von Doz. Dr. J. Stöckigt mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Seit Oktober 1979 habe ich eine Stelle als teilzeitbeschäftigte Wissenschaftliche Hilfskraft inne.

